

Doktori (Ph. D.) értekezés



Fehérjékkel stabilizált arany/ezüst kétfémes nanoklaszterek

Turcsányi Árpád

Témavezető:

Juhászné Dr. Csapó Edit
egyetemi docens

Kémia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Szeged

2025

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A méretcsökkentés hatásai: a nanorészecskék és a nanoklaszterek.....	6
2.2. A nanoklaszterek előállítási lehetőségei	10
2.3. Fehérjék felhasználásával előállított nanoklaszterek főbb sajátságai	15
2.3.1. Marha szérum albumin alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek	15
2.3.2. Lizozim alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek	16
2.3.3. Gamma-globulin alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek	17
2.3.4. Transzferrin alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek.....	18
2.4. A nanoklaszterek képződési mechanizmusa.....	20
2.5. A nanoklaszterek meghatározó tulajdonságai	25
2.5.1. Felépítésük, szerkezetük	25
2.5.2. Az optikai tulajdonságokat befolyásoló tényezők.....	26
2.6. Kétfémes nanoklaszterek.....	29
2.7. A nanoklaszterek vizsgálati lehetőségei	30
2.8. A nanoklaszterek felhasználási területei.....	31
3. Célkitűzés	36
4. Felhasznált anyagok és vizsgálati módszerek	37
4.1. Felhasznált anyagok	37
4.2. Szintézisek.....	38
4.2.1. A nemesfém-alapú egyfémes NCs előállítási protokolljai.....	38
4.2.2. A nemesfém-alapú kétfémes NCs előállítási protokolljai.....	39
4.2.3. Poliszacharid alapú kolloidális hatóanyag-hordozó részecskék kialakítása	41
4.3. Vizsgálati módszerek	44
4.3.1 Optikai sajátságok meghatározásához alkalmazott műszerek	44
4.3.2 A NCs jellemzéséhez alkalmazott műszerek	48
4.3.3 Szenzorikai vizsgálatok	54
4.3.4 Biológiai vizsgálatok	54
5. Eredmények és értékelésük	55
5.1. BSA-nal stabilizált egy- és kétfémes NCs	55

5.1.1. Az előállítási protokollok kidolgozása	55
5.1.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése	60
5.2. LYZ-mal stabilizált egy- és kétfémes NCs	65
5.2.1. Az előállítási protokollok kidolgozása	65
5.2.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése	69
5.3. Poliszacharid-alapú kolloid részecskék fluoreszcens jelölése	73
5.3.1. Az egyfémes NCs kölcsönhatása a poliszacharid-alapú kolloid részecskékkel .	73
5.3.2. A kétfémes NCs kölcsönhatása a poliszacharid-alapú kolloid részecskékkel	80
5.4. γG-nal stabilizált egy- és kétfémes NCs	83
5.4.1. Az előállítási protokollok kidolgozása	83
5.4.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése	86
5.5. Tf-nel stabilizált egy- és kétfémes NCs	91
5.5.1. Az előállítási protokollok kidolgozása	91
5.5.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése	94
5.5.3. Szenzorikai vizsgálatok	102
5.5.4. Biológiai aktivitást mérő vizsgálatok	107
6. Összefoglalás	109
7. Summary	112
8. Irodalomjegyzék	115
Köszönetnyilvánítás.....	120
Publikációs lista	121
Függelék.....	123

Rövidítések jegyzéke

3-HAA:	3-hidroxiantranilsav
γ G:	γ -globulin
AA:	antranilsav
AIE:	aggregáció-indukált emisszió
aCSF:	mesterséges gerincvelő folyadék
Asn:	<i>L</i> -aszparagin
ASer:	<i>N</i> -acetyl-szerotonin
BSA:	marha szérum albumin
CD:	cirkuláris dikroizmus (spektroszkópia)
Cys:	<i>L</i> -cisztein
d_H :	hidrodinamikai átmérő
DOX:	doxorubicin
Chit:	kitozán
DLS:	dinamikus fényszórás
EDX:	energiadiszerzív röntgenspektroszkópia
FRET:	Förster-féle rezonancia alapú energiaátadás
FT-IR:	Fourier-transzformációs infravörös (spektroszkópia)
GSH:	glutation (γ -glutamil-ciszteinitil-glicin)
His:	<i>L</i> -hisztidin
HKyn:	3-hidroxi- <i>DL</i> -kinurenin
HSA:	humán szérum albumin
HTA:	5-hidroxitriptamin (szerotonin)
HTrp:	5-hidroxitriptofán
HyA:	hialuronsav (a hialuronsav Na-sóját használtuk)
i.e.p.:	izoelektromos pont
IF:	impakt faktor
ITC:	izoterm titrációs kalorimetria
Kyn:	<i>DL</i> -kinurenin
Kyna:	kinurénsav
LOD:	kimutatási határ
LSPR:	lokalizált felületi plazmon rezonancia

LYZ:	lizozim
MALDI:	mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizáció
Mel:	melatonin
Met:	<i>L</i> -metionin
MMT:	tiazolilkék tetrazólium-bromid
NAD:	nikotinamid adenin dinukleotid
NC:	nanoklaszter
NCs:	nanoklaszterek
NP:	nanorészecske
NPs:	nanorészecskék
PA:	pikolinsav
PAMAM:	poliamidoamin
PBS:	foszfát-pufferelt sóoldat (pH = 7,4; 0,9 m/m% NaCl)
QA:	kinolinsav
QY:	kvantumhatásfok
SEM:	pásztázó elektronmikroszkópia
SERS:	felületerősített Raman-spektroszkópia
TA:	triptamin
TEM:	transzmissziós elektronmikroszkópia
TCSPC:	időkorrelált egyfotonszámlálás
Tf:	humán apo-transzferrin
TOF:	repülési idő analizátor
TPP:	pentanátrium-tripolifoszfát (Na ₅ P ₃ O ₁₀) anionja
Trp:	<i>L</i> -triptofán
Tyr:	<i>L</i> -tirozin
XA:	xanturénsav
XPS:	Röntgen fotoelektron spektroszkópia

1. Bevezetés

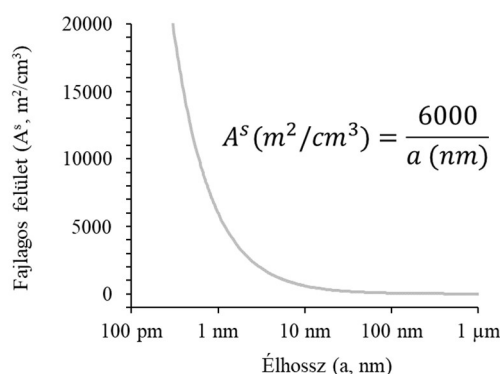
A méretcsökkentés igen nagy hatással van egyes anyagok fizikai-kémiai tulajdonságaira, hiszen új, a tömbi fázisra nem jellemző sajátságok jelennek meg. A kis mérettel járó nagy fajlagos felület jelentősége az adszorpció, a heterogén katalízis vagy a gyógyszerészet területén is kiemelkedő. Különösen látványos a méretcsökkenés a nemesfémeknél, ahol erősen megváltoznak az anyag tulajdonságai, pl. szín, vezetőképesség, ill. olyan új, egyedi jellemzők is megjelennek, mint a felületi plazmon rezonancia a nanorészecskék (NPs), vagy a fluoreszcencia a nanoklaszterek (NCs) mérettartományában. Ezen új tulajdonságok számos alkalmazási területet nyitnak meg, melyek közül kiemelendő a katalízis, az elektronika, az analitika vagy a képalkotás. A NCs sajátságai eredményesen módosíthatók a nanoklasztert (NC-t) alkotó atomok számával, minőségével (pl. egy- vagy kétfémes rendszerek), azok oxidációs állapotával, valamint a stabilizáló ligandum megválasztásával. A csökkenő méret egyre nagyobb felületi többlet szabadenergiával jár, és a rendszer destabilizálódását elkerülendő szükségessé válik stabilizálószer alkalmazása. Ezt a szerepet a fehérjék kiválóan betöltik, mert képesek a NCs felületének stabilizálása mellett azok szelektív funkcionálására, ezen felül redukálószerként is szerepet játszhatnak a NCs képződési folyamatában, és saját egyedi tulajdonságaiknak köszönhetően további sajátságokkal ruházhatják fel az adott nanoszerkezetet. Ilyen pl. a specifikus kötőhely jelenléte, ami elősegíti adott molekulák megkötődését vagy enzimátikus funkció kialakítását a NCs felületén. A NCs optikai sajátságai révén eredményesen használhatók fluoreszcens jelölés, képalkotás, ill. analitikai érzékelés területén, továbbá a fehérjével stabilizált NCs esetén lehetőség nyílik hatóanyag-hordozóként történő alkalmazásukra is. Egyes felhasználási területek megkövetelik a (nano)anyagok biokompatibilitását, a szervezetben feldúsulás elkerülését, de az is elvárás, hogy kiemelkedő fotostabilitással és kvantumhatásfokkal rendelkezzenek. Az újonnan előállított nanoszerkezeteknél elengedhetetlen azok kolloidkémiai stabilitásának ellenőrzése biológiailag releváns közegekben (pH, ionerősség, specifikus reakciók hatásai stb.), és kölcsönhatásuk vizsgálata sejtekkel/szövetekkel.

Doktori értekezésemben olyan fehérjével stabilizált arany/ezüst kétfémes NCs előállítását és fizikai-kémiai valamint kolloidkémiai jellemzését mutatom be, melyekre korábbi szakirodalmi adatok nagyrészt nem találhatók. Az újonnan tervezett anyagokat poliszacharid alapú hatóanyag-hordozó részecskék fluoreszcens jelölésére, illetve a triptofán bomlástermékek analitikai érzékelésére kíséreltük meg felhasználni.

2. Irodalmi áttekintés

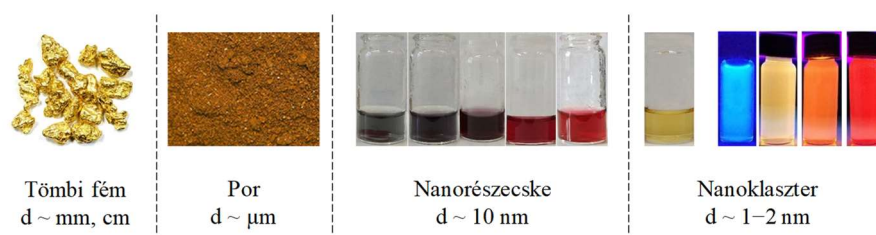
2.1. A méretcsökkentés hatásai: a nanorészecskék és a nanoklaszterek

A kolloidkémia és határfelületi fizikai kémia terén elért eredmények egyértelművé tették, hogy a méretcsökkentés (ezzel a fajlagos felület növelése) hatásai nem elhanyagolhatók a tudomány világában ^{1,2}. Jól szemlélteti ezt, ha egy 1 cm³-es kocka felületét határozzuk meg különböző aprítási állapotok mellett. A méretcsökkenés miatti fajlagos felület növekedése a kocka esetén az **1. ábrán** látható. Az ép, 1 cm élhosszúságú kocka felülete 6 cm². Ezt a kockát minél kisebb kockákra vágjuk szét, annál nagyobb lesz az adott 1 cm³-es térfogathoz tartozó fajlagos felület (A^s , m²/cm³-ben megadva). Az 1 mm élhosszúság esetén a teljes felület értéke $10 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 6 \text{ mm}^2 = 6000 \text{ mm}^2$, azaz 60 cm² lesz, de 100 nm-es kockák esetén ez az érték már 60 m²-re nő. A felület ilyen mértékű növekedése kiemelkedő jelentőségű a kémia szempontjából, mivel a nagy felület nagy felületi energiával is jár (hiszen új felület kialakítása, és annak megtartása energiaigényes folyamat), és a szilárd fázist a környezetétől elválasztó, ún. határfelületi rétegben olyan jelenségek zajlanak le, melyek eltérnek a tömbi fázis(ok)ban tapasztalt viszonyoktól ^{1,3}. Jelentősége kiemelkedő az adszorpció, a heterogén katalízis és a nanotechnológia területén is.



1. ábra: A fajlagos felület (A^s) változása 1 cm³ össztérfogatú kockák élhosszána (a) függvényében

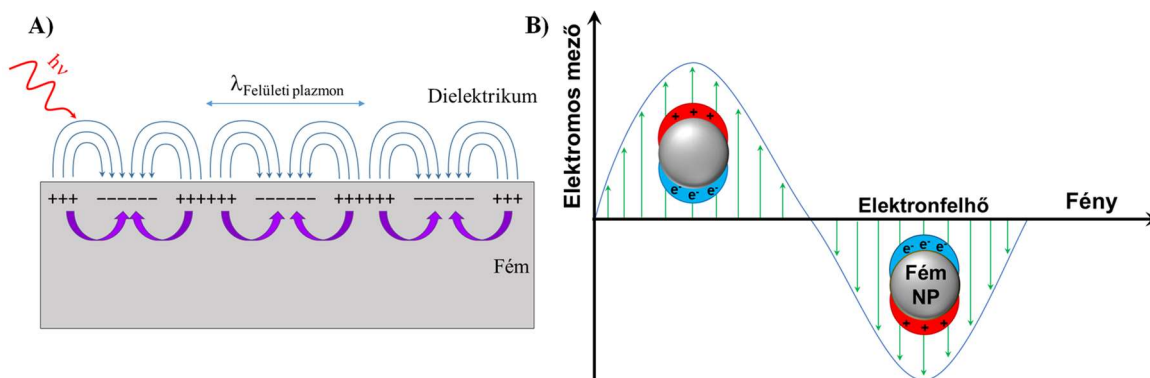
Hasonlóan más anyagokhoz, a nemesfémek tulajdonságai is megváltoznak, ha méretüket csökkentjük. Tömbi fázisban az arany fémes fényű, jellegzetes színű, ahogy az a **2. ábrán** is látható. A fém ilyen formában jól megmunkálható (gondoljunk az aranyfűstre), jó elektromos vezető, inert anyag. Felhasználása e tulajdonságaiból fakadóan igen sokrétű: ellenállósága és jó alakíthatósága, szépsége miatt az ékszerészet, művészet is szívesen alkalmazza, de gazdasági jelentősége is nagy (lásd aranystandard).



2. ábra: A méretcsökkentés hatása az arany optikai tulajdonságaira

Inertsége és jó vezetőképessége az elektronikában teszi kiváló alapanyaggá, míg könnyű alakíthatóságát a fogászatban időtálló fogtömések készítésére használják. Por formájában (μm -es tartomány) az arany viszont már barna színű, elveszti fémes fényét. Ha a részecskeméret a kolloid mérettartományba ($d = 1\text{--}500\text{ nm}$), ezen belül a nanorészecskék (NPs) tartományába ($d = 1\text{--}100\text{ nm}$) esik, akkor az anyag új tulajdonságokra tesz szert ⁴. Az Au NPs megnövelt fajlagos felületük mellett diszpergált (szétoszlatott) formában más színűek attól függően, hogy milyen méretűek. Ezt a jelenséget az okozza, hogy az anyag meghatározott energiájú fényt nyel el, ami ún. felületi plazmonok kialakulására fordítódik, ahogyan azt a **3. ábra** is szemlélteti ^{3,4}. A NPs-et tartalmazó szolok színe ennek az elnyelt hullámhosszú fénynek a komplementere lesz: a nagyobb részecskék kisebb energiájú (vörös), míg a kisebbek magasabb energiájú (kék-lila) fényt nyelnek el, így a nagyobb részecskék diszperziója kék színű, míg a méret csökkentésével lila, majd vörös lesz a színük. Az elnyelt fény frekvenciája azonos lesz a létrejött felületi plazmonéval, ezzel kialakul a lokalizált felületi plazmon rezonancia (LSPR) jelensége ⁴. Ennek lényege, hogy a nanorészecskében (NP-ben) található szabad elektronok együttesen képesek oszcillálni (azaz plazmont hoznak létre). Ha a részecske mérete megközelíti az elektron átlagos szabad úthosszát (ami aranyban $\sim 50\text{ nm}$), akkor a felületi plazmonok frekvenciája és sávszélessége a módosított Mie-elmélettel még jól leírható ⁵. A felületi plazmonokat természetesen a részecskék mérete mellett további jellemzők is befolyásolják, mint a részecske alakja, a felület érdessége, a felület összetétele vagy aggregátumok jelenléte. Az Au NPs a kialakult új tulajdonságaik révén többek között az elektronika ^{6,7}, a katalízis ^{8,9} vagy a gyógyszerkutatás ¹⁰ területén jelentenek potenciális alapanyagot. Az Au NPs jó vezetőképességgel is rendelkeznek, ezáltal képesek megnövelni a vezetést mikroelektronikai áramkörökben ⁶. Fontos szerep jut nekik nyomtatott áramkörök készítésénél a vezető tinták kialakításában. A technika segítségével lehetővé válik hajlékony, nyomtatható elektronikai elemek gyártása, mint nyomtatott áramköri lapok, hajlítható kijelzők és szenzorok.

Alkalmazásuk elősegítheti okostelefonok, tabletek vagy hordható okoseszközök fejlesztését is. A részecskék egyedi plazmonikus sajátosságai felhasználhatók a fény nanométeres szinten történő modulálására is ¹¹. A plazmonikus NPs képesek megnövelni a fényelnyelést fotovoltaiikus napelemekben, ezért alkalmazásuk ezen a területen ígéretes, bár hatásmechanizmusuk még vitatott ¹².



3. ábra: A felületi plazmon kialakulása A) fémben és B) fém NPs-ben (jobbra) ¹³

Az aranyról sokáig úgy tartották, hogy katalitikusan gyakorlatilag inert, mert a Gibbs-féle szabadentalpiája szerint nem oxidálható (Au_2O_3 -ra $\Delta G^0_k > 0$), és a sima felületén az oxigénmolekula nem képes kemisorpcióra vagy disszociációra. Haruta ⁸ és Hutchings ⁹ munkái azonban bebizonyították, hogy fém-oxid alapú katalizátorokon a kisméretű (< 5 nm) Au részecskék képesek reakciókat katalizálni, ami annak köszönhető, hogy a tömbi aranyhoz viszonyítva a lecsökkent méret miatt jelentősen megnő a NPs felületén a csúcsokon és éleken elhelyezkedő atomok aránya. Különleges optikai tulajdonságaik miatt előszeretettel alkalmazzák őket a képalkotás, számítógépes tomográfia és fotoakusztikus képalkotás területén is ⁶. A NPs felületét stabilizáló molekulák helyes megválasztásával elérhető hatóanyagok kapszulázása, ill. a hordozó célzott szövetbe, szervbe történő juttatása is ¹⁰.

A méret további csökkentésével elérünk egy kritikus méretet, ahol a részecske mérete összemérhető a szabad elektron Fermi-hullámhosszával (0,5–1 nm). A Fermi-hullámhossz az elektron egy fontos kvantummechanikai jellemzője szilárd anyagokban, ez az elektron átlagos de Broglie-féle hullámhossza az anyag Fermi-felületéhez közel ¹⁴. A Fermi-hullámhossz tulajdonképpen az elektron Fermi-energiájának egy származtatott mennyisége; ez az az energiakülönbség (ΔE), ami egy fém abszolút nulla fokon ($T = 0 \text{ K}$) értelmezett Fermi-szintje, azaz a legmagasabb betöltött egyedi részecske energiaszint és a legalacsonyabb energiájú be nem töltött energiaszint között van. A Fermi-energiát (E_F)

megadhatjuk háromdimenziós, nem relativisztikus, egymással nem kölcsönható elektronokra (**1. egyenlet**):

$$E_F = \frac{\hbar^2}{2m_0} \left(\frac{3\pi^2 N}{V} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (1)$$

ahol $\hbar = h/2\pi$, ebből $\hbar$ a redukált Planck-állandó, h a Planck-állandó ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js), m_0 az elektron nyugalmi tömege, N az elektronok száma, V a vizsgált rendszer térfogata, N és V hányadosa pedig az elektronsűrűség (n). Fémek esetén a szabadelektron modellt alkalmazva a vezetési sávban lévő elektronokra, az N/V átlagosan 10^{28} – 10^{29} elektron/ m^3 , így a Fermi-energia 2–10 eV közé esik. A Fermi-energiából származtatható a Fermi-momentum, ennek értéke (**2. egyenlet**):

$$p_F = \sqrt{2m_0 E_F} \quad (2)$$

továbbá kifejezhető

$$p_F = \hbar k_F \quad (3)$$

alakban is (**3. egyenlet**), ahol

$$k_F = (3\pi^2 n)^{\frac{1}{3}} \quad (4)$$

a Fermi-hullámvektor (**4. egyenlet**). Ebből származtatva a Fermi-hullámhossz (**5. egyenlet**)

$$\lambda_F = \frac{h}{p_F} \quad (5)$$

vagy (**6. egyenlet**)

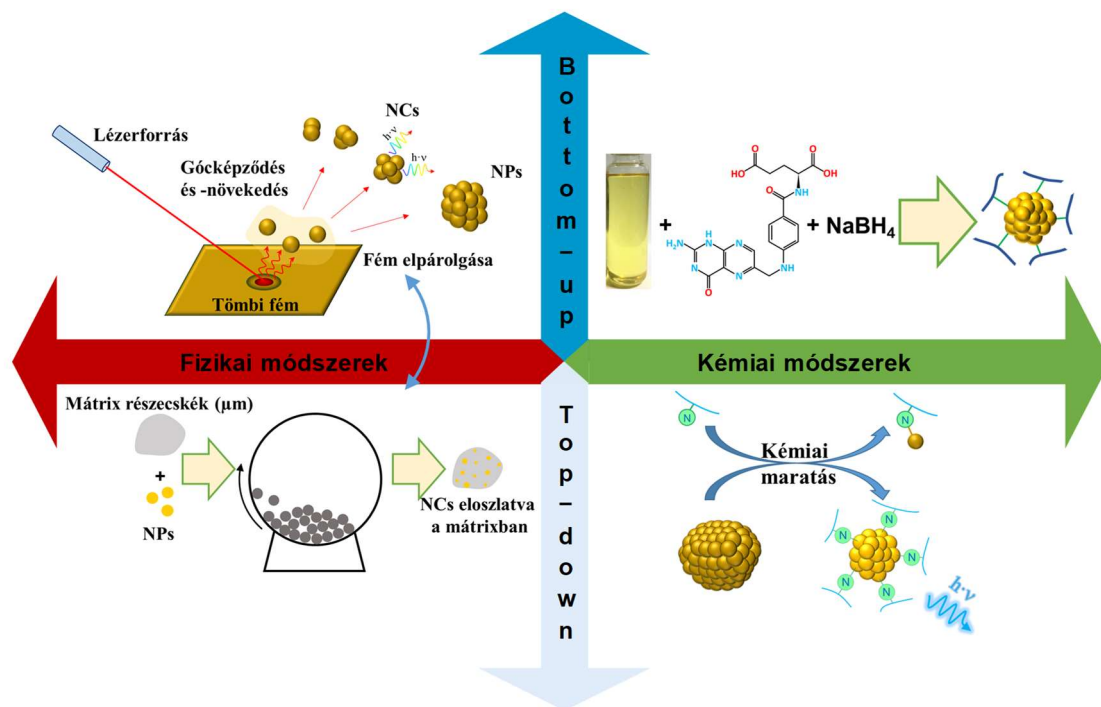
$$\lambda_F = \left(\frac{2\pi}{3n} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (6)$$

A Fermi-hullámhossz értéke Au esetén, ahol az elektronsűrűség ($n = N/V$) 300 K-en $5,90 \cdot 10^{28} m^{-3}$, a számolás alapján $3,29 \cdot 10^{-10} m = 0,33$ nm. Ebben a mérettartományban már nem képes plazmon kialakulni, és a folytonos vezetési sáv diszkrét energiaszintekre válik szét. Ennek köszönhetően a kialakuló részecske, azaz a NC molekulához hasonló tulajdonságokra tesz szert, melyek a klasszikus kolloid NPs-re már nem jellemzőek. Ezek közé tartozik a fluoreszcencia jelenléte, különleges, a tömbi fázistól eltérő mágneses sajátságok^{15–18}, redoxi sajátság megjelenése vagy a kiralitás^{19,20}.

Doktori értekezésem alapját a NCs jelentették, így a folytatásban ezeknek a nanoszerkezetű anyagoknak a jellemzésére térek ki részletesebben.

2.2. A nanoklaszterek előállítási lehetőségei

Kisméretű, lumineszcens NCs-et már az 1990-es években is előállítottak¹⁴. Szintézisük során különös jelentőséggel bírnak a kísérleti paraméterek a képződő termékek méretére, szerkezetére, a fém oxidációs állapotára és felületi jellemzőikre, így az optikai tulajdonságaikra. A legfontosabb előállítási paraméterek a reagensek minősége és azok koncentrációi (fémion prekursor, ligandum, redukálószer, oldószer), az oldat pH-ja (vizes közegben), a hőmérséklet és a reakcióidő. Bizonyos esetekben, ha a ligandum megfelelő redukáló tulajdonsággal bír, akkor a hozzáadott extra redukálószer kihagyható, mert ezt a szerepet a ligandum (pl. a fehérjék²¹) is képes ellátni. Ezeknek a ligandumoknak a gyakorlati jelentősége éppen ebből adódik, hiszen így módon elkerülhető az egyéb, gyakran toxikus redukálószer alkalmazása, melyek eltávolítása sok esetben nehéz és körülményes. Még szélsőségesebb példa az *N,N*-dimetil-formamid esete, ami képes az oldószer, a redukálószer és a stabilizátor feladatát egyszerre ellátni²². A NCs előállítása többféle módon is történhet, ahogyan azt a **4. ábra** is összefoglalja.



4. ábra: A NCs lehetséges előállítási módszereinek osztályozása

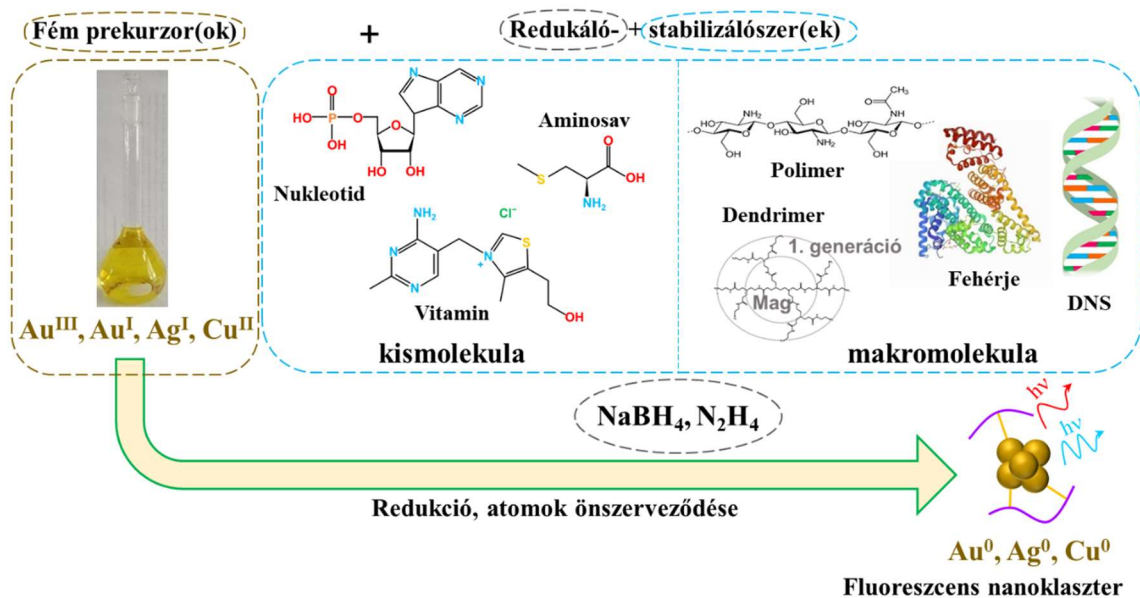
Ismeretesek fizikai és kémiai módszerek, emellett „fentről-le” (top-down) és „lentől-fel” (bottom-up) irányú folyamatok alapján történő csoportosítás is használatos²³. A fizikai eljárásoknál tulajdonképpen a felhasználni kívánt fém fizikai technikák segítségével aprítják megfelelő méretre. Ez történhet például lézeres elpárologtatással¹⁴, ahol az

alkalmazott nagy energiájú lézer impulzusok elpárologtatják a fémeket, ami ezután részecskékké áll össze, köztük NCs-ké is. Mivel a folyamat során a NCs a fémgőzben lévő atomokból jönnek létre, ez a „lentől-fel” eljárások közé sorolható; a folyamat egészét tekintve, miszerint tömbi fémből juthatunk NCs-hez, viszont a „fentről-le” típusba tartozna. Tiszán „fentről-le” irányuló előállítás lehet a nagy energiájú golyósmalmos őrlés, ami jellemzően μm -es részecskékből vagy NPs-ből kiindulva állít elő NCs-et. Ez az eljárás nem igazán alkalmas egyedülálló NCs előállítására, sokkal inkább szilárd mátrixban elosztatott NCs készítésére alkalmazzák ²⁴. A kémiai eljárások során általában valamilyen redoxireakció zajlik le, jellemzően egy fém prekursor sót vagy komplexet redukálnak, és a létrejövő fématomok önszerveződése révén – stabilizálószer alkalmazása mellett – spontán kialakulnak a NCs. A „fentről-le” eljárások esetén a NCs-et a kiindulási fém méretének csökkentésével érjük el. Ilyen eljárás például a kémiai maratás (*etching*), ahol nagyobb méretű fém NPs méretét egy maratószer segítségével csökkentjük le. A „lentől-fel” (bottom-up) irányú megoldások esetén a NCs-et egyedi alkotóelemeiből építjük fel, ehhez ligandumokat vagy ún. templátot alkalmazhatunk. Különböző ligandumokkal stabilizált, 2 nm-nél kisebb NCs akár atomi pontossággal is előállíthatók ^{19,25,26}, illetve pontosan felderített kristályszerkezetük is ^{26,27}.

A fent említett módszerek mellett nagy jelentőségűek azok a megoldások is, ahol több módszer előnyeit kombinálják. Nagyon gyakori, hogy a kémiai úton történő előállítás valamilyen technikával van támogatva, például a kémiai reakciók felgyorsítása mikrohullámú melegítéssel ²⁸ vagy ultrahangos besugárzással ^{29,30} is történhet. Ezeknek a módszereknek a legnagyobb előnye, hogy jelentősen képesek lerövidíteni a reakcióidőt, esetleg csökkenteni a szükséges reaktánsok (például költséges, kis mennyiségben rendelkezésre álló ligandumok) koncentrációját.

A kémiai előállítási módszerekhez (**5. ábra**) – melyekkel disszertációmban kizárólagosan foglalkoztam – a következő összetevők szükségesek: *fémion prekursor*, ez az adott fém egyik sója vagy komplexe; *redukálószer*, ez felelős a fémionok redukciójáért; *stabilizálószer*; feladata a kialakuló NC-magok stabilizálása, és azok megfelelő képződésének biztosítása; és az *oldószer*, mely a reakció lejátszódási közegét biztosítja és alkalmazásával a reakciópartnerek homogenizálása is megtörténik. A NCs előállításához használt fémsók (jellemzően hidrogén-terakloro-aurát – HAuCl_4 – és ezüst-nitrát – AgNO_3 – az Au és Ag NCs esetén) redukálása legtöbbször oldószerben történik. Tipikus redukálószer közé tartozik a nátrium-borohidrid ²⁵ vagy a hidrazin ³¹, míg a

stabilizálószeres szerves közegű szintéziseknél általában foszfor- és kéntartalmú vegyületek és származékaik (foszfinok ²⁶, tioalkoholok ³² stb.), de lehetnek egyéb vegyületek is (pl. acetilének ²⁷). Az oldószer tekintetében sok előállítási protokoll szerves oldószerben ^{26,27} történt, majd egyre gyakoribbá váltak a vizes fázisú, ún. zöldkémiai szintézisek ^{21,33}.



5. ábra: A nemesfém NCs kémiai úton történő előállításának általános sémája eltérő méretű és funkciójú molekulák felhasználásával

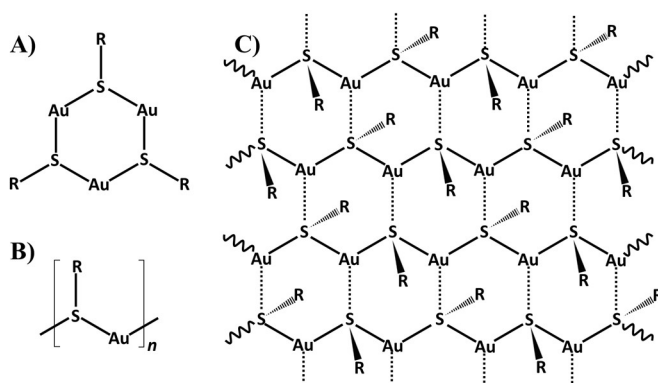
Szerves közegben jó fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező termékeket nyerhetünk, melyek jól tisztíthatók és kristályosíthatók, illetve szerkezetük is jól szabályozható. Hátrányuk viszont az, hogy vízben nem „oldhatóak”, ami korlátozza orvosi területen történő felhasználásukat. Egy megoldás erre a problémára a fázistranszfer-típusú előállítás volt, ahol a NCs szintézise szerves közegben zajlott, majd egy amfipatikus stabilizálószer alkalmazásával a képződő NCs-et a vizes fázisba juttatták. A korai szintézisek között találunk fázistranszfer (pl. felületaktív anyagok) segítségével végbemenő reakciókat (ezekre az első megjelent cikk után Brust-módszerként hivatkoztak ^{32,34}). Ezekon kívül szilárd fázisú reakcióban is sikeresen állítottak elő fluoreszcens NCs-et ³⁵. Murugadoss és mtsai. szilárd kitozán, AgNO_3 és NaOH porok megfelelő arányú összekeverésével és eldörzsölésével, majd HAuCl_4 oldattal végzett további dörzsöléssel állítottak elő vörösen emittáló Au/Ag NCs-et. A munka során achát mozsárban egyszerű dörzsöléssel állították elő a NCs-et, amiket ezután 4-nitrofenol katalitikus redukálására használtak fel ³⁵. A módszer segítségével nem kvantitatív redukciót értek el az Au tekintetében (tisztán Au használatával nem is ment végbe a reakció), míg a kapott részecskeméret transzmissziós elektronmikroszkópos

mérések alapján 2–3 nm-nek adódott. Melléktermékként 50–70 nm méretű Ag NPs-et is kaptak, ami magyarázza az Ag NPs LSPR sávjának megjelenését 400–500 nm között. A vizes közegű szintézis megvalósítása sokkal nehezebb volt az oldószer egyedi tulajdonságai miatt. A fellelhető előállítások között találhatunk olyan eseteket, ahol kismolekulákkal^{36–39}, illetve makromolekulákkal^{35,40–45} állítottak elő NCs-et. A stabilizátorokból kialakuló ligandumréteg szerepe sokrétűbb, mint csak a nanoszerkezet stabilitásának biztosítása. Kisméretű ligandumok alkalmazásával jellemzően kék/zöld emisszióval rendelkező NCs hozhatóak létre, míg makromolekulák segítségével inkább vörös vagy már a közeli infravörös tartományban emittáló rendszereket kapunk.

A fém tekintetében a leginkább vizsgált NCs Au-ból készültek^{19,21,24,46}. Az Au-hoz képest jóval kevesebbet állítottak elő más fémből, a leggyakoribbak az Ag⁴⁷, Cu^{31,43}, Pt^{48,49} és Cd⁵⁰. Ezek mellett Fe-ra^{15,16}, Co-ra^{17,51}, Ni-re^{18,52,53}, Ir-ra⁵⁴ és Os-ra⁵⁵ is találunk példákat, de természetesen más elemekkel is lehetséges a szintézis mind kémiai, mind fizikai megoldásokkal. Mivel az Au szoft fémnek minősül, ezért az ilyen rendszerek főleg tiolát típusú ligandumokkal hozhatóak létre. A tiolát stabilizáló molekulák általános jelölése SR, ahol az -R egy alkil láncot jelöl. Pontosan ismert, stabil szerkezetek Au NCs-nél például az Au₂₅(SR)₁₈, Au₃₈(SR)₂₄, Au₁₀₂(SR)₄₄, vagy az Au₁₄₄(SR)₆₀. Az első szerkezet esetében különböző mérési módszerekkel (pl. röntgen krisztallográfia) már a pontos szerkezet meghatározása is megtörtént, többféle oxidációs állapotnál is (–1, 0 és +1 össztöltés mellett⁵⁶). Mivel a NCs előállításakor legtöbbször monodiszperz rendszereket kapunk, melyek viszont nem rendelkeznek atomi pontossággal, a szerkezetük meghatározása jóval nehezebbé válik. A tiollal stabilizált NCs fontos hátránya rossz vízoldhatóságuk mellett az alacsony kvantumhatásfokuk is (QY < 1 %) ⁵⁷.

Nagy jelentőséggel bírnak a NCs előállításában a N-tartalmú ligandumok is ⁵⁸, pl. aminosavak⁵⁹ és származékaik⁶⁰, peptidek és fehérjék²¹, polimerek^{40,61}, dendrimerek⁴¹ és nukleobázisok is³⁹. Ezekre a vegyületekre is igaz, hogy egyszerre képesek a stabilizáló- és a redukálószer szerepét betölteni. Ahhoz, hogy ez teljesüljön, az amin származék oxidációs potenciáljának elég magasnak kell lennie a fémionok (pl. [AuCl₄][–]) redukálásához, máskülönben hozzáadott redukálószer (pl. NaBH₄) lesz szükséges a NCs képződéséhez. Aminosavakkal döntően kéken emittáló NCs állíthatók elő, ezekben az atomok száma 3–10 közötti lehet⁵⁹. Eredményes a NCs kialakulása azon aminosavaknál, melyek oldalláncukban aromás gyűrűt tartalmaznak (pl. *L*-triptofán (Trp): indol, *L*-hisztidin (His): imidazol, *L*- tirozin (Tyr): fenol, *L*-fenilalanin (Phe): benzol). Az eddig nem említett aminosavak közül

a *L*-cisztein (Cys) és *L*-metionin (Met) tiol, ill. tioéter oldallánccal rendelkeznek, ezekkel sárga és vörös tartományban fluoreszkáló szerkezetek hozhatók létre⁶². A Met segítségével eredményesen alakíthatók ki Au NCs, de a Cys esetén $(-S-Au-S-Au-S-)_n$ általános szerkezetű, ciklikus polimert, ún. koordinációs polimer (*coordination polymer*) szerkezetet nyerünk, amiben az Au +1-es oxidációs állapotú⁶³ (**6. ábra**). Fluoreszcens Au NCs előállíthatók polimerek (pl. polivinilpirrolidon) használatával is^{40,41,64}. Nátrium-borohidrid és poliamidoamin (PAMAM) dendrimerek alkalmazásakor az utóbbiak templátként szolgálnak a NCs kialakításához.



6. ábra: Az Au(I)-tiolát komplexek lehetséges szerkezetei: A) gyűrűs oligomer, B) polimerlánc monomeregysége, C) polimerláncok réteges szerveződése⁶³

Az Au(III)-ionok és a dendrimer amin- és karboxilcsoportjai között kötés jön létre, ami irányítja a NC-magok létrejöttét és stabilizálja azokat. A fém:ligandum mólarány változtatásakor különböző méretű NCs nyerhetők, melyek az UV-Vis-közeli IR tartományban emittálnak ($\lambda = 380-870$ nm), a QY jellemzően 10–70 %-os⁶⁴.

A makromolekulákkal végzett NC-szintézis történelmében meghatározó volt Xie és munkatársai 2009-es munkája²¹, ahol elsőként írták le Au NCs marha szérum albuminnal (BSA-nal) történő előállítását. Ezt a közleményt követően számos egyéb publikáció is született hasonló rendszerek kialakításáról. A BSA mellett más fehérjéket is vizsgáltak (pl. lizozim⁶⁵, tisztított tojásfehérje⁴⁹, papain⁴⁴), illetve más fémekkel is előállítottak fluoreszcens NCs-et (pl. Ag⁶⁵, Cu⁶⁶, Pt⁴⁹, Cd⁵⁰). A számtalan gyakorlati előnyüknek köszönhetően a NCs között kiemelt figyelmet kaptak a fehérjével előállított rendszerek. A fehérjék megfelelő aminosav oldalláncai képesek a fémionok elsődleges megkötésére (koordinálására), emellett aromás oldalláncai megfelelő kísérleti körülmények (pl. magas pH) mellett szerepet játszanak a koordinált fémionok redukálásában. A fehérjék nagy előnye, hogy megfelelően enyhe előállítási körülmények alkalmazásakor (pl. vizes közeg, 37 °C)

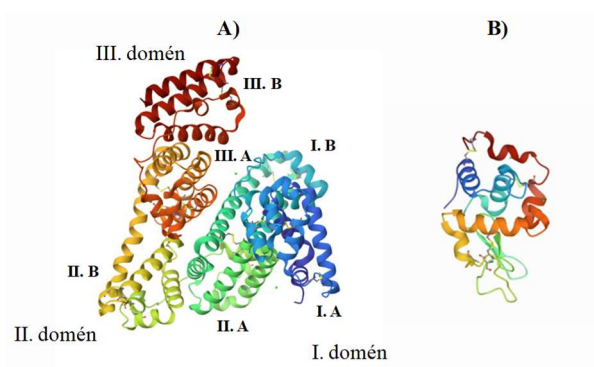
képesek részben megőrizni az eredeti biológiai funkciójukat (pl. enzimek, ^{43–45}), ezáltal a létrehozott NC egy multifunkciós rendszer lesz. A fehérjék alkalmazása további előnyökkel is jár, hiszen biomolekulák révén képesek megnövelni a termékként kapott NCs biokompatibilitását, emellett gyakran rendelkeznek specifikus kötőhelyekkel, ahol bizonyos molekulák meg tudnak kötődni. A fehérjék nyújtotta előnyös tulajdonságok kiaknázhatók a NCs különböző célokra történő felhasználásakor (pl. katalízis ⁴⁵, hatóanyag szállítás és terápiás kezelés ⁶⁶, analitikai érzékelés ⁶⁷, fluoreszcens sejt- és szövetjelölés ³¹). Fontos szempont még az orvosbiológiai, gyógyszerészeti területeken, hogy a szervezetben található sejtek gyakran rendelkeznek fehérje receptorokkal, így ezek a sejtek jól célózhatók a megfelelő NCs-ekkel, ami a fluoreszcens képalkotás, illetve célzott terápia során is előnyös lehet ⁶⁶.

Doktori értekezésemben fehérjékkel-stabilizált nemesfém-alapú NCs fejlesztésével foglalkoztam, így a következő 2.3. fejezetben néhány releváns nemzetközi közlemény eredményét foglalnám össze, mint munkám közvetlen előzményeit.

2.3. Fehérjék felhasználásával előállított nanoklaszterek főbb sajátosságai

2.3.1. Marha szérum albumin alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek

A szérum albumin fehérjék nagy mennyiségben találhatók meg a vérben, szerepük a hormonok, zsírsavak és kismolekulák szállításában ^{21,68}. A vérben a szérum albumin egy Au(I) kötőhellyel lehet az Au szállító molekulája. A BSA szerkezetében több kötőhely is található (7. A) ábra), ahol többféle molekula is képes megkötődni, ezzel elősegítve a megfelelő célba történő eljutásukat, illetve hasznosulásukat a szervezetben. A BSA egy széles körben használt plazmafehérje, molekulatömege ~ 66 kDa ^{21,68}.



7. ábra: A) A BSA és B) a LYZ szerkezete

Szerkezetében 35 db Cys és 21 db Tyr található, ami jelentős a nemesfém NCs előállítás szempontjából. Xie és mtsai. BSA-nal végzett jelentős munkájukban a NC-szintézist egyszerű, „zöldkémiai” eljárásként jellemezték, mivel vizes közegű, mellőzi toxikus vegyszerek használatát és a stabilizátor is biológiai eredetű ²¹. Az előállításnál a BSA „biomineralizációs” tulajdonságát használták ki, miszerint a fehérje eredményesen képes fémionokat megkötni. Az előállítás során igen magas koncentrációjú BSA-oldathoz (5 ml, 50 mg/ml) adták a prekursor HAuCl₄ vizes oldatát (5 ml, 10 mM) 37 °C-on. Két percnyi keverést és homogenizálást követően a rendszerhez NaOH-oldatot adtak (0,5 ml, 1 M), majd 37 °C-on 12 óra elteltével vörösen emittáló Au NCs képződtek. Az előállítás során a fehérje képes volt a fémionok koordinálására, majd a pH emelésével (pH ~ 12) a BSA megnövelt redukáló hatását kihasználva *in situ* keletkeztek a NCs. A termék összetételét mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizáció repülési idő analizátorral felszerelt (MALDI-TOF) tömeg-spektrometriás mérésekkel azonosították, ahol 25 atomból álló NCs képződését feltételezték. Röntgen fotoelektron spektroszkópia (XPS) mérésekkel megállapították, hogy az Au 0 és +1 oxidációs állapotban van jelen, ebből utóbbi (kb. 17 %) a NCs felületén helyezkedhet el, és segíti a rendszer stabilizálását, hasonlóan az alkil-tiolát ligandumokhoz. A fluoreszcencia maximuma (λ_{em}) 640 nm (gerjesztési maximum $\{\lambda_{gerj}\}$ 480 nm), a QY ~ 6 % (fluoreszcein standard mellett, 470 nm lézer fényforrást alkalmazva). Kiemelték a fehérje nyújtotta biokompatibilitás jelentőségét, emellett a szintézis környezeti és anyagi előnyeit (nem túl magas hőmérséklet, megújuló forrásból származó alapanyag, víz az oldószer, mérgező és drága segédanyagok mellőzése). Habár a disszertációban – terjedelmi korlátok miatt is – csak néhány releváns, BSA felhasználásán alapuló közlemény eredményeit említem, de számos további publikáció is elérhető ^{30,47,50,69}, melyek esetén közel azonos, viszonylag magas fehérje koncentrációk alkalmazásával, 37 °C-on kivitelezett szintéziseket mutatnak be. A dolgozatban leírt kísérleti munkánk során e publikált eljárások finomítását céloztuk meg mind a felhasznált fehérje mennyiségét (ha lehet), mind a hőmérsékletet szabályozva, minimalizálva a fehérjeszerkezet szintézis közbeni megváltozását.

2.3.2. Lizozim alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek

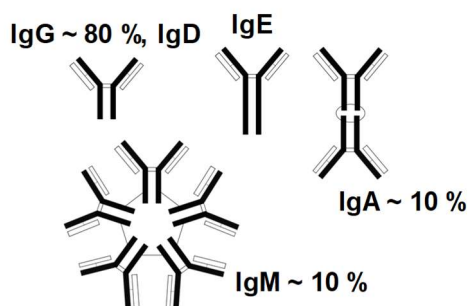
A lizozim (LYZ) fehérje (**7. B) ábra**) a legkisebb a disszertációban vizsgált fehérjék közül; molekulatömege ~ 14,3 kDa ³¹. Erősen kationos enzim, a tojásfehérjéből kivont LYZ izoelektromos pontja (i.e.p) = 11,35 ⁷⁰. Tulajdonságait tekintve antibakteriális, mert

enzimként képes peptidoglikán makromolekulákban az (1-4)- β -glikozidos kötéseket hasítani az *N*-acetyl-muraminsav és az *N*-acetyl-D-glükózamin alegységek között (ilyen kötések találhatók a Gram-pozitív baktériumok sejtfalában). E kötések felhasításával a baktérium sejtfala meggyengül, ami végül annak felszakadását váltja ki. A LYZ sok kiválasztott testnedv egyik alkotója, mint a nyál, az anyatej, vagy a korábban említett tojásfehérje, amiben kifejezetten nagy mennyiségben található meg. 129 aminosavból áll, ebből 8 Cys, melyek négy diszulfidhidat képesek kialakítani a 6–127, 30–115, 64–80 és 76–94 pozíciók között ⁷¹. Habár a fehérje önmagában egyaránt alkalmas nemesfém NCs és NPs előállítására is ⁷², néha hozzáadott redukálószer alkalmazása is szükségessé válik ^{31,65}. Kímélőbb redukálószernek számít a ditiotreitól (DTT). Szerepe a fehérje diszulfidhídjainak felbontása, ezáltal elősegíti a fémionok megkötését a molekulában, így a NCs kialakulása is könnyebbé válik. Sarkar és mtsai. ⁶⁵ DTT-lal redukált LYZ fehérjét használtak Ag NCs előállítására vizes közegben. A DTT segítette a vörösen emittáló NCs kialakulását, amiket eredményesen alkalmaztak Cu²⁺-ionok és B₁₂-vitamin érzékelésére. Értelmezésük szerint a DTT redukálja a kén-kén kötéseket, ezáltal tiol csoportokat kialakítva a fehérjében, amik segítenek stabilizálni a NC-magot Ag⁺-tiol motívumok kialakításával. A hatékony redukciót a pH = 11,8-ra növelésével segítették elő, aminek hatására kialakul a NC-mag, mivel az Ag⁺ ebben a környezetben képes Ag⁰ állapotra redukálódni. A termékre $\lambda_{em} = 640$ nm, a $\lambda_{gerj} = 360$ nm körüli, emellett rendelkezik még egy gyenge emissziós csúccsal 450 nm-nél. Helyesen kivitelezett szintézissel a QY > 6 % (kinin-szulfát standard alkalmazásakor). Egy fémet nem tartalmazó, azonos körülmények között kivitelezett reakcióval igazolták, hogy a másodlagos csúcs a NCs-et stabilizáló LYZ fehérjétől származik. A NCs szintézisét a DTT nélkül is megkísérelték, hiányában nem fluoreszkáló terméket kaptak. LYZ esetén egy publikációban foglalkoztak kétfémes Au/Ag NCs-ekkel ⁷³, azonban ennél a rendszernél nem volt tapasztalható az Ag hatása a NCs optikai sajátosságaira, így munkánk során az előállítási folyamat ismételt kidolgozását kíséreltük meg.

2.3.3. Gamma-globulin alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek

A gamma-globulin (γ G) valójában egy fehérjekeverék, a vérplazma elektroforézissel történő szeparálása során az utolsó frakciót alkotja. Benne többféle szerkezetű immunoglobulin (pl. IgA, IgG, IgM stb.) található ⁷⁴, ahogyan azt a **8. ábra** is szemlélteti, ezért a γ G molekulatömege is egy átlagos érték, 150 kDa. A legfőbb összetevő IgG-re az izoelektromos

pont értéke 4,6–6,5 közötti ^{46,75}. Másodlagos szerkezetében nem található α -hélix, viszont jelentős arányban (közel 50 %) találunk β -redőzött szerkezetet.



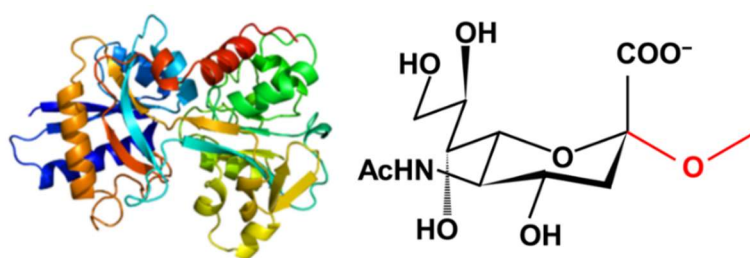
8. ábra: A γ G-t alkotó immunoglobulinok sematikus szerkezete és %-os eloszlásuk ⁷⁴

Elsőként csoportunkból Ungor Ditta PhD munkájának eredményeképpen került bemutatásra Au NCs γ G-nal történő szintézise ⁴⁶, de kétfémes NCs kialakíthatóságával már nem foglalkozott. PhD munkája során 645 nm-en emittáló NCs-et állított elő, amiket a Kutatócsoport mtsai-val a triptofán bomlástermékek szelektív érzékelésére fejlesztett. A fehérjeszerkezet vizsgálatokor bizonyították, hogy a NC-képződés jelentősen csökkenti a β -redő arányát (28 %-ra). A γ G-Au NCs triptofán bomlástermékeivel való kölcsönhatása során igazolták, hogy az *L*-kinurenin (Kyn) esetén figyelhető meg csak domináns kioltás (a LOD értéke 15–22 μ M a vizsgált közegtől függően). Hőmérsékletfüggő kioltási mérésekkel bizonyították, hogy a mechanizmus – a meghatározott termodinamikai paraméterek alapján – egy dinamikus kioltás. A rendszer gyakorlati előnyeit egy papír alapú teszt elkészítésével is demonstrálták, amivel már 5 μ M koncentráció mellett pillanatszerűen ki tudták mutatni a Kyn jelenlétét.

2.3.4. Transzferrin alkalmazásával szintetizált nanoklaszterek

A transzferrin (Tf) típusú fehérjék feladata a vas(III)-ionok megkötése és szállítása a szervezetben. A humán apotranszferrin egy 678 aminosavból álló glikoprotein; szintézisekor még 697 darab alkotja, de egy 19 aminosavból álló szakasz lehasad róla a képződés után. Harmadlagos szerkezete két alegységből áll, a vasionokat két kötőhelyen képes fogadni (egy-egy a két alegységen). Le Guevel és mtsai. emberi apo-transzferrin (vasat nem tartalmazó) stabilizátorral állítottak elő Au NCs-et ⁷⁶, melyek mérete 2 nm-nél kisebb, valószínűleg 22-33 atomból állnak. A minta vörösen emittál ($\lambda = 695$ nm), QY = 4,3 %. A NCs kölcsönhatását vizsgálták antitestek és vasionok jelenlétében is, de ezek nem voltak hatással a NCs optikai tulajdonságaira, és a NCs sejtölő hatást sem mutattak. Sha és mtsai. szintén Tf-nel hoztak létre Au NCs-et ²⁸. Munkájuk során mikrohullámú melegítéssel

segítették a kémiai reakciót, amivel a szintézisidőt 3 percre csökkentették. A barna termékből ultraszűrőssel távolították el a vörös emisszióval rendelkező ($\lambda = 663$ nm) NCs-et. A termék QY-a ~ 10 % (mikrohullámú szintézisnél 10,4 %, míg jóval hosszabb vizes közegű szintézissel csak 9,2 %), az átlagos élettartam pedig 667 ns. A NCs-et szerotonin (5-hidroxitriptamin, HTA) kimutatására használták fel. A Tf felületén található szialilezett glikozidcsoportok, ezeken képes megkötődni a detektálni kívánt HTA, ezzel megnövelve a NC emissziós intenzitását. A szialilcsoport egy kilenc szénatomos cukor, a szialsav (itt *N*-acetil-neuraminsav) származéka, ami a Tf felületén lévő glikozidcsoporthoz glikozidkötéssel csatlakozik (9. ábra).



9. ábra: A Tf harmadlagos szerkezete (balra), és a szerotonin megkötődését biztosító szialilcsoport szerkezeti képlete (jobbra) ²⁸

A glikozidcsoportok pozíciója az aszparagin oldalláncoknál (Asn) található, ezek az Asn-413 és Asn-611 (a két alegységen a 19 aminosavas szakasz leválása után; egyébként Asn-432 és Asn-630 ⁷⁷). A Tf és a HTA közötti kölcsönhatás létrejöttét ζ -potenciál mérésekkel és TEM felvételekkel is igazolták. A LOD 49 nM-nak adódott, ami összemérhető a HTA kimutatására használt egyéb módszerekével ⁷⁸ (és a ²⁸-ban foglaltak).

A Tf használatával Cu NCs is kialakíthatók. Goswami és mtsai. Tf-Cu NCs-et formuláltak doxorubicin (DOX) hatóanyaggal NPs-ké ⁶⁶. A NPs-et biológiai képalkotásra és célzott terápiára használták fel. A NCs-et hidrazin (N_2H_4) redukálószerrel alkalmazva állították elő, a Tf itt a stabilizátor szerepét töltötte be. A NCs képződését a minta liláról barna színre történő változása is igazolta, emellett TEM felvételekkel az átlagos méretük 2,1 nm-nek adódott. MALDI-TOF mérések alapján az alkotó Cu atomok száma 3, 5 vagy 7 lehet, míg XPS mérések alapján Cu(0) és Cu(I) jelenléte feltételezhető (a kötési energiák eltérése 0,1 eV erre a két formára). A Cu NCs 460 nm-en emittálnak, QY = 7,5 % (kinin-szulfáthoz viszonyítva). A rendszerben Förster-féle rezonancia-alapú energiaátadást (FRET) használnak ki. Ennek alapja, hogy a Cu NCs emissziós sávja ($\lambda_{em} = 460$ nm) részben egybeesik a DOX hatóanyag elnyelési sávjával ($\lambda = 480$ nm). A folyamatban a Cu NCs nem

emittálnak fotonokat, hanem az energiát közvetlenül átadják a DOX molekuláknak, amik ennek hatására saját emissziós hullámhosszikon ($\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$) intenzíven fognak fluoreszkálni. A folyamat tulajdonságaiból eredően erősen érzékeny a donor (Cu NC) és az akceptor (DOX) távolságára, illetve a megfelelő emissziós és elnyelési sávok átfedésére. Ebben a rendszerben sikeresen kombinálták a két anyagot, és *in vivo* is vizsgálták a rendszer alkalmazhatóságát Dalton limfóma ascites (DLA) sejteken. A rendszer alkotói szinergisztikusan hatnak a TfR túltermelő DLA sejtekkel szemben, kihasználva a nagymértékű hatóanyag kapszulázást, tumorsejt targetáló hatást és a FRET segítségével a nyomon követést képalkotás segítségével. A vizsgált sejtek (normál sejtek és TfR túltermelő rákos sejtek, mint az emberi méhnyakrák sejtek {HeLa} és mellrák sejtek {MCF-7}) a TfR mennyiségének függvényében szelektíven képesek felvenni a hatóanyagot tartalmazó részecskéket, ezzel célzottá téve a potenciális terápiás kezelést. A Tf esetén is találhatunk tudományos közleményeket egyfémű NCs előállítására, de kétfémű rendszerekről (köztük Au/Ag NCs-ről) nem lelhető fel információ. Doktori tanulmányaim során ezzel a fehérjével is törekedtünk kétfémű NCs kialakításának a megvalósítására.

2.4. A nanoklaszterek képződési mechanizmusa

A NCs pontos képződési folyamata nem ismert, a reakciótermékek minősége függ a reaktánsok kezdeti arányától, a pH-tól és egyéb paraméterektől. A reakció összességében nem sztöchiometrikus, és a végtermék több különböző, bizonytalan mennyiségű és minőségű anyagból áll. Az Au vegyületeiben a lehetséges oxidációs állapotok -1 és $+5$ közöttiek lehetnek, ezek közül a NCs-nél jelentősége a 0 , $+1$ és $+3$ állapotoknak van. Az elektronszerkezet Au(0) esetén $5d^{10}6s^1$, Au(I)-nél $5d^{10}6s^0$ és Au(III)-nál $5d^86s^0$. Az Au NCs előállításánál a prekursorok Au(III) és Au(I)-komplexek lehetnek, az elektronszerkezetből jól látható, hogy a $+1$ -es oxidációs állapot kiemelkedő stabilitással bír ⁷⁹, ez kísérleti és számításos eredmények alapján is a legstabilabb forma. Az Au(III) komplexképzést követően redukálódik Au(I)-é (biológiai körülményeket mintázó közegekben is). Ezzel szemben az Au(I) az ismert diszproporció ellenére, ahol a **7. egyenlet** szerint fémes Au(0) és Au(III) keletkezik, stabil komplexeket képes létrehozni a megfelelő ligandumokkal.

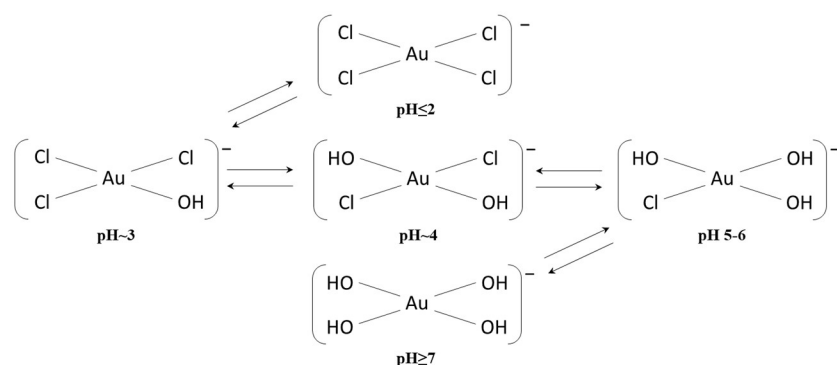


Az Au(I) (hasonlóan más d^{10} elemekhez) lineáris, míg az Au(III) síknégyszetes komplexeket képez. A koordinációs komplexek kialakulását alapvetően Pearson hard-szoft sav-bázis

elméletével magyarázhatjuk⁸⁰. Az arany esetén a +1-es állapot szoft donor atomnak számít, míg a +3 átmenet a szoft-hard sajátság között, emiatt a létrejövő komplexeik stabilitását a ligandum fogja meghatározni. Ha a ligandum donoratomjának elektronegativitása növekszik, akkor a komplexek stabilitása egyre inkább csökkenni fog. Más fémekhez hasonlóan a komplexek stabilitása alacsony oxidációs számoknál szoft, míg magas oxidációs számoknál inkább hard donoratomokkal biztosítható. Ennek megfelelően az Au(I) forma stabilabb komplexeket képez S, Se, P és C donorokkal (pl. tiol, szelenol, foszfin és alkilvegyületek), míg az Au(III) inkább a nagyobb elektronegativitású N, O, F és Cl donorokkal alkot stabil komplexeket (lásd a $[\text{AuCl}_4]^-$ -ot). Ugyanebből az okból kifolyólag az Au(I) hard donorok jelenlétében diszproporcionálódik Au(0) és Au(III) formákká, míg az Au(III) szoft atomok jelenlétében Au(I) formává redukálódik. Komplexeikben ezért az Au(I) gyakran rodanid, cianid, tioszulfát ionokkal szerepel (lásd pl. az Au cianidos lúgozása). Nem szabad azonban eltekinteni az egyes specieszek redoxi sajátságaitól sem, mivel ezt a hard-szoft elmélet nem képes magyarázni⁸⁰. Az Au elektrokémiai potenciálja a legmagasabb az összes fém közül ($E^0 = +1,69 \text{ V}$), ezért az Au(I) és Au(III) formák is szinte bármelyik redukálószerként viselkedő anyagtól elektronokat vesznek fel. A standard redoxipotenciál értékek alapján az Au(III)-vegyületek könnyedén elreagálnak a szoft nukleofil vegyületekkel, ami az ilyen komplexek alacsony stabilitását is okozza.

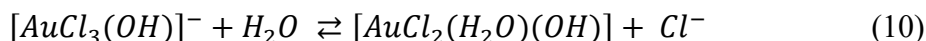
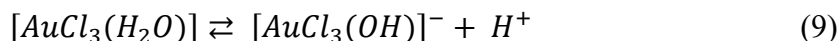
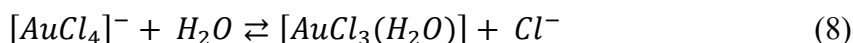
Az Au(III) forma stabilitása különleges a 11-es csoport elemei (Cu, Ag, Au) között, a jelenség hátterében az egyes elemek ionizációs energiái állhatnak: míg Ag esetén az első, addig Cu esetén a második, Au esetén pedig a harmadik ionizációs energia a legalacsonyabb a két-két másik elemhez viszonyítva⁷⁹. Az Au(I) és Au(III) szabad ionként vizes közegben nem léteznek, inkább akvakomplexeiket képeznek megfelelő számú koordinált atommal. Vízkomplexeik igen reaktívak, mivel oxigén a donoratom, így az akvakomplexeik alacsony stabilitásúak, és igyekeznek az oxigént (így a vizet) másik ligandumra cserélni.

Az Au(III) halogenid komplexei közül a $[\text{AuCl}_4]^-$ kutatása kiemelt jelentőségű. A $[\text{AuCl}_4]^-$ anion sem stabil vizes közegben, és spontán hidrolizál a **10. ábrán** látható egyensúlyi reakciók szerint. Az O-donor ligandumok koordinálódását erősen meghatározza azok típusa; az OH^- erősen kötődik az Au(III)-hoz, a H_2O kötése labilis.



10. ábra: Az Au(III) kloro- és akvakomplexek vizes közegben a pH-tól függően ⁷⁹

Robb és mtsai. ⁸¹ a $[\text{AuCl}_4]^-$ vízzel való reakcióját vizsgálták, és javaslatot tettek a reakciót leíró egyenletekre **(8–10 egyenletek)**:

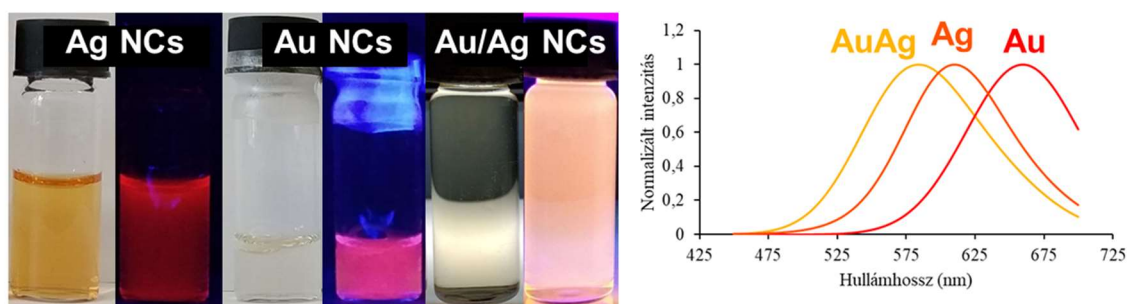


Az Au(III) természetesen kelátképzéssel is stabilizálható. Többfogú amin ligandumokkal (pl. etilén-diamin) képzett komplexeik stabilnak mutatkoznak biológiailag releváns körülmények mellett, azonban instabilak S-donor ligandumok (biomolekulák) jelenlétében. Egyszerűbb Au(III) komplexeiről ismert azok citotoxikus hatása is, ezek stabilak fiziológiás körülmények mellett, és gátolják a sejtosztódást rákos szövetekben ⁸². Az Au-vegyületek reakcióképességét erősen meghatározza még az oldószer, a pH, a redoxipotenciál és a koordinálódó ligandum anyagi minősége is. Már az 1970-es évek óta ismert, hogy a HAuCl_4 képes oxidálni az aminosavakat (például a metionint metionin-szulfóxiddá), míg maga Au(I)-é alakul. Egy tipikus NC-előállítási reakcióban az Au(III) forma a ligandum és a redukálószer jelenlétében először Au(I)-é, majd Au(0)-vá alakul. Az Au(III) esetén a reakció sebessége erősen függ attól, hogy a központi Au-hoz milyen ligandumok kapcsolódnak. Szívesen alkalmaznak az említett sajátosságok miatt tiolokat ligandumként, mert erős Au-S kötések képesek létrehozni az Au(III)-ionok Au(I)-formába történő átalakulásával kísérve, emellett a kötés erőssége jelentős a fémes Au(0) formával is. A tiollal stabilizált NCs-re jellemző, hogy azok mérete csökken a ligandum:fém molarány növelésével. A hasonló NCs QY-a jellemzően alacsony, 1 %-nál kisebb ⁸³. Az olyan biomolekulák, mint a peptidek és fehérjék bizonyítottan alkalmasak a NC-képződés és stabilizálás elősegítésére. Ezek a

vegyületek szabályozzák a NCs nukleációját és növekedését. Egy Gly-Gly-His tripeptid komplexet tud képezni a $[\text{AuCl}_4]^-$ -tal ⁷⁹, síknégyszetes geometriát követve, mind a négy N-atom részvételével (amincsoport, két deprotonált peptid amidcsoport és a hisztidin imidazol oldallánc N-je). Glutathion (GSH) használatakor, ami egy rövid, háromtagú tripeptid (γ -glutamil-ciszteinil-glicin), elkerülhető a redukálószer használata, mert ezt a feladatot maga a GSH képes elvégezni ^{79,83}. Au(I) esetén a GSH-hoz hasonló, tioltartalmú kétfogú ligandumok részvételével még $(-\text{AuSR}-)_n$ típusú koordinációs polimerek kialakulása is elképzelhető, mellette a monomer $\text{Au}(\text{SR})_2$ (szerkezetük a **6. ábrán** látható). Nagy a jelentősége ezeknek a koordinációs polimereknek, mivel számos esetben (lásd Cys, GSH) lumineszcens NCs helyett ilyen termékek keletkezhetnek, és biztosítják a kialakult rendszer magas emisszióját. Ezeket a polimereket legtöbbször rendezett szerkezet jellemzi (pl. dupla hélix ⁸⁴, redőzött szerkezet ⁸⁵), amit az egyes atomok között kialakuló aurofil kölcsönhatások, hidrogénkötések illetve egyéb másodlagos kötőerők stabilizálnak. Ha sikerül GSH-nal NCs-et előállítani, akkor az eredmény egy vörös-közeli IR tartományban emittáló rendszer lesz. Viszonylag alacsony tiol:Au mólarány alkalmazása mellett (1,5:1) a NCs QY-a közel 15 % ^{57,86}, de itt is a kialakult fémmagot körülvevő tiolát-Au(I) stabilizáló koordinációs polimer réteg lesz a felelős az erős fluoreszcenciáért.

Fehérjék stabilizálószerként való alkalmazása esetén a nagyméretű ligandum megnehezíti a termék NCs pontos atomszámának és szerkezetének megállapítását. Tovább bonyolítja a helyzetet, ha a NC több fémből épül fel, ugyanis ilyenkor elképzelhető többféle összetétel egy rendszerben, és az atomok egyedi elhelyezkedése is nagyon változatos lehet. Bizonyos, hogy a NCs képződése jelentősen megnöveli a stabilizálószerként szolgáló fehérjemolekulák méretét, amit korábban már mérésekkel is igazoltak. A jelenség azzal magyarázható, hogy a fémek beépülése megváltoztatja a molekula szerkezetét, majd a NC-magok növekedése tovább torzítja azt, a fehérjelánc úgymond kitekeredik ⁷¹. A fémionok másodlagos kötések kialakítása révén szívesen képeznek adduktumokat a fehérjékkel, jellemzően a szabad karboxilcsoportokkal. A nemesfémek esetén viszont a reakció a Cys oldalláncok tiolcsoportjával történik, és kovalens kötés jön létre ⁷¹. A fehérjék Cys és His oldalláncai képesek az Au(III)-ionokhoz koordinálódni, míg a Tyr csoportok redukálják azokat. Ahhoz, hogy a Tyr erős redukálóképességgel rendelkezzen, a szintézist a fehérje viszonylag magas koncentrációja mellett hajtják végre (jellemzően $c > 0,62 \text{ mM}$). Fontos a pH helyes megválasztása az előállítás során, mert a Tyr $\text{pH} > 10$ felett (Tyr pK_a értéke) rendelkezik megfelelő redukálóképességgel ²¹, illetve az oldat pH-ja befolyásolja a fehérje

konformációját és stabilizálóképességét is. A NC-előállításra használt fehérjék közül a leggyakrabban és legrégebb óta használt a BSA ²¹. Az első megjelent irodalmi cikk óta számos fehérjével sikeresen állítottak elő NCs-et, mint a LYZ, a transferrin típusú fehérjék vagy a torma peroxidáz. Fehérjékkel jellemzően QY = 2,0–12,0 % alakítható ki ^{43,46,48,76}, de ennél jóval magasabb értékekkel is találkozhatunk ^{31,49}. A fehérje: Au molarány változtatásával különböző méretű és emissziós maximummal rendelkező termékeket kaphatunk ⁷². Jellemzőek a vörös-közeli IR tartományba eső fluoreszcencia maximumok, itt a NCs 20–25 Au atomból állnak ²¹. A reakció hőmérséklete szintén befolyásolhatja a reakció menetét, mivel hatással van a reakciósebességre, a fehérje másodlagos szerkezetére, és ezen keresztül a NCs méretére. A fémionok megkötődése jelentősen módosítja a fehérje másodlagos szerkezetet, mivel a kén-kén kötések felhasadnak, és a hidrogénhidak száma is lecsökken, így a fehérje egy kitekeredett állapotba jut. Az arany redoxireakcióját tekintve nehéz megállapítani, hogy a reakció egy koordinált ligandum cseréjén keresztül vagy a redoxpartnerek közvetlen elektronátadásával zajlik. Ez utóbbi esetén meghatározó, hogy a ligandum képes-e hídkomplex kialakítására. Isab és mtsai. vizsgálták bisz(trietil-foszfín)-arany(I)-klorid BSA-nal való kölcsönhatását ⁸⁷. Méréseik alapján az Au(I) komplex a Cys-34 jelzésű oldallánccal reagál, termékként trietil-foszfint (PEt₃) és BSA-Au-PEt₃ komplexet eredményezve (a BSA esetén is S a koordinálódó atom). Ebben a reakcióban a PEt₃ redukálja mind a Cys-34, mind a BSA egyéb diszulfid kötéseit, melyek annak harmadlagos szerkezetét stabilizálták. A **11. ábra** néhány fehérjével stabilizált egy- és kétfémes NC-diszperzió fotóját mutatja természetes fény mellett és UV-lámpa alatt, azok karakterisztikus emissziós spektrumaival együtt.



11. ábra: A) Fehérjével stabilizált ezüst, arany és arany/ezüst kétfémes NCs fotói természetes fény mellett és UV-fénnyel történő megvilágítás hatására és B) a NCs jellemző (normált) fluoreszcencia emissziós spektrumai

2.5. A nanoklaszterek meghatározó tulajdonságai

2.5.1. Felépítésük, szerkezetük

A NCs néhánytól pár tíz atomból álló objektumok ⁴. Az első, fém-fém kötéseket tartalmazó NCs-et (Mo és W) már a 19. században szintetizálták ^{88,89}, de szerkezetüket csak az 1940–50-es években határozták meg (pl. $[\text{Mo}_6\text{Cl}_8]^{4+}$ ⁹⁰), a klaszter kifejezést pedig 1963–64-ben kezdték el használni F. A. Cotton javaslatára ^{91,92}. Az első, vegyületben létező Au NCs (pl. $\text{Au}_{11}\text{I}_3(\text{PPh}_3)_7$, ⁹³ és a benne foglalt hivatkozások) és Ag NCs szintézise 1960–1970 közé tehető ^{93,94}. A kutatóknak sikerült izolálni Au_7 klasztereket vegyületből is, de a nemesfém NCs-et a vegyületek mellett a fémek elpárologtatásával is létrehozták ⁹⁵. Paolo Chini munkássága nyomán sikeresen állítottak elő karbonil ligandumokkal is fém NCs-et (pl. Pt_{38} , ⁹⁶), majd később megjelentek a hidrid, olefin, alkin, izocianid és foszfin ligandumok is ⁹⁷. Egyes Au NCs szerkezetére javaslatokat is tettek, mint pl. a későbbi $\text{Au}_{25}(\text{SR})_{18}$ -ban is megjelenő Au_{13} -mag ^{56,97}. A NCs-ben az atomok számára nem létezik pontos kritérium, mivel a NC tulajdonságai erősen függenek a szerkezetétől (geometriájától) is ⁵⁶, így helyesebb az egyedi sajátásaik alapján definiálni őket. A kisméretű NCs egyedi tulajdonságai az ún. kvantum-berekesztés (*quantum confinement*) jelenségéből erednek ⁴. Ha az atomok száma elegendően alacsony (< 130) egy részecskében, akkor a NC-re kimérhető HOMO-LUMO szint lesz jellemző, illetve molekuláris fotofizikai tulajdonságokkal fog rendelkezni. Ennél nagyobb méret esetén már folytonos vezetési sáv jelentkezik, és a rendszer inkább a plazmonikus NPs közé fog tartozni. A NCs-re jellemző fluoreszcencia függ a NC méretétől, emellett a felületén található ligandumok minőségétől és mennyiségétől is ⁵⁶. A ligandumok képesek megváltoztatni a NCs tulajdonságait, hiszen befolyással vannak az alkotó atomok oxidációs tulajdonságaira és közvetlen környezetére is. A ligandumok eltérő kötésekkel (kovalens, ionos, elektrosztatikus) képesek kapcsolódni a NC-hez, illetve a kapcsolódó csoport magtól vett távolsága is meghatározza hatásukat. A NC közvetlen fémes felületétől távolabb eső csoportok ennél fogva kisebb hatással bírnak, mint az ahhoz közeli, vagy akár közvetlenül kötődő ligandumok. A ligandummal stabilizált (nem csupasz) NCs-ben egy merev, meghatározott kristályszerkezetű fémmagot egy laza, dinamikus mozgó ligandumréteg vesz körbe. Ez utóbbi egy nanométeres tartományba eső határfelületet képez a NC és környezete között, és ez a ligandumréteg szabályozza az ionok és kisebb molekulák diffúzióját, emellett helyet biztosít bizonyos molekuláknak a NC-rel való kölcsönhatásra (pl. fehérjék esetén azok kötőhelyei).

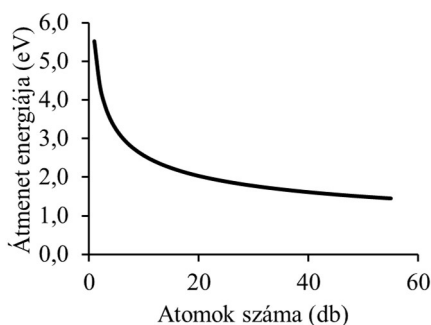
2.5.2. Az optikai tulajdonságokat befolyásoló tényezők

A lumineszcens NCs igen alacsony QY-kal rendelkeznek (az elnyelt energiának csak nagyon kis hányada távozik emittált fotonként). Az első előállított NCs esetén ez az érték még 0,1 % alatti, ami még így is jelentősen magasabb a tömbi aranyra jellemző 10^{-10} értéknél⁸³. Más lumineszcens anyagokhoz viszonyítva gyakorlati felhasználásuk ezen alacsony QY miatt sokáig nem volt életszerű³³. A kéntartalmú stabilizátorok változtatásával, illetve az előállítási módszerek optimalizálásával látványos javulást tudtak elérni, ezzel a QY értékét már néhány tíz %-ra lehetett emelni^{86,98}. A NCs által mutatott fluoreszcencia jelenségét a tudósok még nem tudták teljesen értelmezni, de már születtek egyszerű leíró modellek. Az optikai tulajdonságok megértése szempontjából kiemelt jelentőségű a szabadelektron elmélet^{14,99}, ami legtöbb esetben jól leírja a NCs viselkedését, viszont nem veszi figyelembe a töltést hordozó részecskék közötti kölcsönhatásokat. Nagyobb méretű NPs esetén a szabad elektronok a részecske felületén külső elektromos tér hatására polarizálódnak, és az elektronok száma fogja meghatározni a plazmonikus sajátságokat. Ha azonban a szabad elektronok száma egy kritikus érték alá csökken, ahol a részecske mérete megközelíti a Fermi-hullámhosszt, az addigi folytonos sáv diszkrét energiaszintekre válik szét. A szintek közötti energiakülönbség (E_δ) értéke határozza meg a NCs fluoreszcenciáját. Ha a hőenergiát adjuk meg határfeltételként ($E_T = k_B T$, ahol k_B a Boltzmann-állandó), akkor a NC csak akkor képes fotont kibocsátani, ha $E_\delta \gg E_T$. Ezzel szemben elektron-lyuk pár akkor alakul ki, ha $E_\delta < E_T$ vagy $E_\delta \sim E_T$. Ilyen esetekben jelentősen megnő a sugárzásmentes legerjesztődés valószínűsége, és lecsökken a rendszer QY-a. A szerves fluoreszcens festékekhez hasonlóan a NCs is erősebben fluoreszkálnak alacsonyabb hőmérsékleten, hiszen E_T értéke ekkor jóval alacsonyabb. Az E_δ értéke egyszerűen kifejezhető a NC-t alkotó Au atomok számával (N) és a Fermi-energiával (E_F) a következő **11. egyenlet** szerint (ez az ún. „jellium-modell”^{14,99}):

$$E_\delta = \frac{E_F}{N^{1/3}} \quad (11)$$

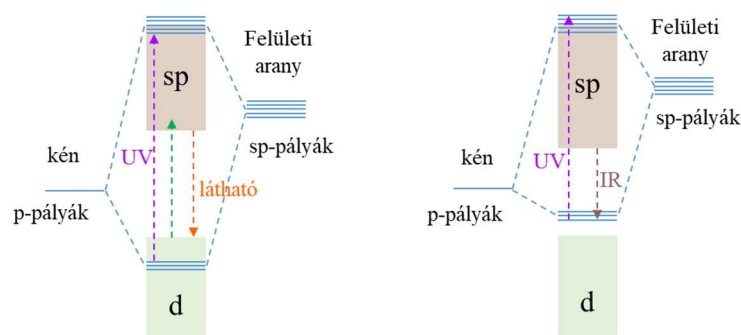
A NCs fluoreszcens fotonjának energiája az alkotó atomok számának függvényében tehát a **11. egyenlet** alapján a **12. ábra** szerint változik (arany esetén). Abban az esetben, amikor az Au NCs fluoreszcenciája csak a fém magon belüli átmenetekhez köthető, a fluoreszcencia vöröseltolódást szenved, ha a NC-t alkotó atomok számát növeljük. Ha az atomok száma 30 fölé emelkedik, akkor a NC a látható tartományon kívül fog emittálni. Az elmélet jól működik bizonyos NCs esetében (pl. PAMAM-mal stabilizált Au NCs,⁶⁴), viszont tiolát ligandummal stabilizált NCs-nél, ahol a méretből adódóan ($d \sim 2$ nm) fluoreszcencia nem

lenne lehetséges, a NCs vörös és zöld tartományban is emittálhatnak, ami más emissziós folyamatok létezését sejteti ¹⁰⁰.



12. ábra: Az Au NCs fluoreszcens fotonjának energiája az Au-atomok számának függvényében

A karakterisztikus fluoreszcencia megjelenésében nemcsak a *fém*mag összetételének, hanem a *felületi ligandumoknak* is meghatározó szerepe van. A NC-t alkotó Au és a tiolát ligandum S-atomja között például töltésátmenet valósulhat meg (fém-ligandum töltésátmenet, LMCT), illetve ha figyelembe vesszük az Au-Au aurofil kölcsönhatást, akkor ligandum-fém-fém töltésátmenet (LMMCT) is létrejöhét (**13. ábra**).



13. ábra: A LMCT/LMMCT átmenetek sematikus ábrázolása látható és közeli IR tartományban mérhető fluoreszcencia átmeneteknél ^{4,58}

Bizonyos Au(I)-tiolát komplexek képesek fluoreszkálni ⁵⁸, például alkil-tiolát ligandumok esetén ennek maximuma 610 nm körüli, ami nagyon hasonló a tioláttal stabilizált Au NCs értékeihez. Ez azt sugallja, hogy az LMCT és/vagy LMMCT jelensége is hozzájárul a NCs fluoreszcenciájához. A kialakuló Au-S kovalens kötések jelentősen befolyásolják a NCs elektronszerkezetét, bonyolult molekulapályákat létrehozva, ami megnehezíti optikai sajátásaik beazonosítását. Ezen NCs emissziója jellemzően a narancs-vörös vagy közeli IR tartományba esik. A NC-ben a S-atom és a fématomok hibrid elektronállapotokat hoznak létre, aminek hatására az sp- és d-pályák között elektronátmenet valósul meg, majd a

legerjesztődés során ($d \rightarrow sp$) a felesleges energia fotonként távozik. Ezek a hibrid pályák az Au(I) ionok esetén a d-pályák alatti energiaszinten találhatók, tehát energiájuk szerint degeneráltak (az sp- és d-pályák is hasonló/azonos energiaszintűek), ezt igazolja az is, hogy a fotonemisszió élettartama függ a gerjesztési hullámhossztól. Más a helyzet az IR tartományban emittáló NCs esetén, ahol az sp hibrid pályák a d-pályák feletti energiaszinten találhatók. Ezek esetén a μs -os élettartam azt sugallja, hogy az átmenet kialakulásában jelentős szerepe van az $Au(I) \leftarrow S$ töltésátvitelnek^{4,58}. A fémközpontú átmenetekhez képest az LMCT és/vagy LMMCT típusú átmenetek esetén a fluoreszcencia élettartama mindig nagyobb, részben azért, mert ezek a folyamatok hatással vannak a gerjesztett állapot relaxációs folyamataira. Az LMCT és LMMCT folyamatokban az elektron $Au \leftarrow S$ irányban mozog, ezért a ligandum elektrondonor sajátsága meghatározó a QY szempontjából⁵⁶. Általánosan elmondható, hogy a S-atom elektrondonor sajátságának növekedésével megnő a fluoreszcencia erőssége. Emellett azt is felfedezték, hogy a felületet stabilizáló ligandumban minél több az elektronban gazdag atom (pl. O vagy N) vagy csoport, annál erősebb lesz a NCs fluoreszcenciája^{20,56}. Ezen felül a ligandumsűrűség a NCs felületén is hatással van a fluoreszcenciára. Minél sűrűbben helyezkednek el a ligandumok, annál nagyobb lesz a fluoreszcencia intenzitása. Ennek az az oka, hogy a nagyobb ligandumsűrűség miatt megnő az LMCT és LMMCT folyamatok valószínűsége, továbbá a kioltó anyagok (pl. O_2 molekula) nehezebben tudják elérni a NCs felületét, gátolva a fluoreszcencia kioltását. Felhasználástól függően lehetséges további növekedés, amit döntően az aggregáció-indukált emisszió (AIE) jelenségének tulajdonítunk^{33,101}. A folyamat lényege, hogy a NCs aggregációja megváltoztatja a stabilizáló ligandumok térszerkezetét, azok sokkal kevésbé lesznek képesek szabadon forogni és rezegni. Ennek hatására lecsökken a sugárzásmentes legerjesztődés valószínűsége, ami közvetve megnöveli a ligandumhoz köthető, fotonkibocsátással járó folyamatok valószínűségét^{28,33,102}. A NC mag oxidációs állapota is hat az optikai sajátságokra. Polietiléniminnel (PEI) stabilizált Au_8 NCs esetén vizsgálták azok optikai sajátságait $NaBH_4$ -del történő redukálás előtt és után¹⁰³. A redukció hatására a NCs eredeti zöld emissziója kékre változott, és az abszorpciós maximum ~ 350 nm-ről 295 nm-re tolódott el. Ez arra utal, hogy a mag oxidációs állapota befolyásolja a mag és a felületi ligandumok közötti kölcsönhatást is. Tioláttal stabilizált NCs esetén a mag oxidációs állapotának hatása főleg az $Au \leftarrow S$ folyamaton keresztül érződik. A NC-mag oxidációja segíti a töltésátmenetet, ezáltal növeli a fluoreszcenciát, míg az Au(I) redukciója Au(0) állapotra hátráltatja a töltésátmenetet, ezáltal csökkentve a fluoreszcencia mértékét⁵⁶.

2.6. Kétfémes nanoklaszterek

A NCs kutatása területén jelentős lépés volt a kétfémes NCs megjelenése ¹⁰⁴. A magban jelen lévő két fém szinergisztikus hatással bír a NCs tulajdonságaira. Ezekben a rendszerekben az egyfémes NCs-hez képest is jóval bonyolultabb állapotok uralkodnak, így még nehezebb a fluoreszcencia mögött álló egyes folyamatok felderítése. Bhunia és mtsai. azt vizsgálták, hogy BSA-nal stabilizált Au/Ag NCs-re milyen hatással van a két alkotó fém molaránya ³⁸. Eredményeik alapján létezik egy olyan összetétel, ahol a fluoreszcencia maximális értéket ad. TEM vizsgálatok alapján az Au NCs, az Ag NCs és a kétfémes NCs mérete közel azonos (< 2 nm), míg XRD mérésekkel igazolták az Au (111) és Ag (200) rácssíkok jelenlétét mintáikban. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia segítségével vizsgálták a NCs szerkezetét is. A BSA spektrumát két negatív csúcs jellemzi 208 és 222 nm-nél, amik egy $n \rightarrow \pi^*$ átmenethez köthetők. A NC-képződés hatására valamelyest változott a BSA szerkezete, és a mért ellipticitás csökkenése az α -hélix tartalom csökkenését jelezte. Ez nem jelenti azonban azt, hogy a fehérje teljesen denaturálódott, a szerkezete csak részlegesen tekeredett ki. Fourier transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópiás mérések eredményei alapján az amid I. ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) és II. csúcsok (1545 cm^{-1}) kiszélesedése is jelzi a NCs kialakulását. A ζ -potenciál értéke alapján a NCs negatív töltéssel rendelkeznek. A NCs UV-látható elnyelési színe jellegzetes sávot nem tartalmaz, ami jellemző a LSPR-t nem mutató NCs-re. Az Ag-tartalom csökkenésével párhuzamosan kékeltolódás tapasztalható a fluoreszcencia spektrumokon, emellett a fluoreszcencia intenzitása egyre csökken. Az 1:4 Ag:Au aránynál készített NCs QY-a lett a legmagasabb, még az Au NCs-hez képest is nagyobb értéket kaptak. Feltételezhető tehát, hogy van egy olyan fémösszetétel, ahol az Ag maximálisan növeli ezt az értéket, ezért ennek optimalizálása elengedhetetlen a NCs fejlesztésekor. Az Ag jelenléte érzékeny teszt a NCs-et az oxidációval szemben, ami az Ag NCs igen rövid élettartamával jár, de a kétfémes NCs-nél sokkal gyengébb ez a hatás. A gerjesztési spektrumok elemzésével megállapíthatók az egyes fotonkibocsátással járó folyamatokhoz tartozó elektronátmenetek. Az Au NCs-nél egy váll és egy csúcs található 335 és 520 nm-nél, ezekből az utóbbi kétfémes NCs-nél 445 nm-re tolódik el (és kísértetiesen hasonlít az Au és Ag NPs plazmon sávjára). A szerzők szerint a kisebb energiájú elnyelés az $S_0 \rightarrow S_1$ átmenethez rendelhető, ahol az S_0 a szingulett alapállapot, míg S_1 az első gerjesztett állapot. A sáv eltolódása az S_1 állapot destabilizálásához köthető, amit az ötvözet mag képződése idézett elő. A váll 335 nm-nél $S_0 \rightarrow S_n$ átmenethez rendelhető, itt

S_n magasabb fokú gerjesztett állapotokat jelöl. Az egyes átmenetek alaposabb vizsgálatához fluoreszcencia élettartamokat is meghatároztak. A kapott eredményeket három exponenciális függvény összegeként illesztették meg. A több tag azt jelenti, hogy az adott hullámhosszon mért fluoreszcencia több egyedi folyamat eredménye. A szerzők szerint a szintetizált NCs-ben a nulla oxidációs állapotú magot egy +1 állapotú fémion réteg veszi körbe, emiatt elektronátmenet mehet végbe a két állapot között, ezt belső elektronátmenetnek nevezzük. A mérések alapján a leggyorsabb lecsengés ehhez a folyamathoz rendelhető (értéke 200–400 ps), míg az 5 ns élettartamot az oldószerfüggő LMCT folyamathoz rendelik. A leghosszabb élettartamú (150–200 ns) tag a HOMO-LUMO átmenethez társítható (ez a vörös emisszió forrása). A nagyobb átlagos élettartam véleményük szerint a hatékonyabb fluoreszcenciát jelzi.

A kétfémes NCs előállítási lehetőségei sokfélék lehetnek. A hagyományos stratégiák mellett lehetséges már kész NCs dópolása, vagy a fémek cseréje adott NCs-ek között ¹⁰⁵. Mohanty és mtsai. BSA-Au/Ag NCs-et állítottak elő az egyfémes NCs keverésével. Méréseik alapján a kétfémes termék magjának összetétele $Au_{38-x}Ag_x$ lehet, a magban a fématomok nulla oxidációs állapotúak, és a kiindulási NCs-hez képest eltérőek az emissziós spektrumok és a fluoreszcencia élettartamok is. Egy másik folyamatban Ag NCs-et dóoltak eredményesen Au^{3+} -ionok segítségével, a két fém között végbemenő redoxireakció útján, amit XPS mérésekkel is igazoltak.

2.7. A nanoklaszterek vizsgálati lehetőségei

A fehérjével stabilizált NCs iránti érdeklődés igen jelentős számos területen, de mivel átmenetet jelentenek a molekulák és a kolloid részecskék között, így pontos szerkezetük, vagy éppen kialakulásuk vizsgálata rendkívül nehézkes, és sok apró részlet még nem került tisztázásra. Baksi és mtsai. kisszögű röntgenszórás (SAXS) segítségével vizsgálták a NCs növekedését oldatfázisban, LYZ-ban és BSA-ban ^{71,106}. Eredményeik azt mutatták, hogy a NCs kialakulása során folyamatosan nő a fehérje mérete, ami annak kitekerekedésével jár. A NCs szintézise során az oldott fehérje komplexet képez az adott fémionnal (pH ~ 5,5), majd a kialakuló adduktumot redukálják a pH ~ 12 körüli értékre emelésével. Míg az adduktum eredményesen vizsgálható ESI-MS technikával, addig a NC nem ionizálódik megfelelően a mintabevitel során. Ezzel a technikával ezért nem is vizsgálták a NCs-et, minden esetben a MALDI-tömegspektrometriát alkalmazták. A szintézisek termékein végzett vizsgálatok betekintést adnak a fehérje héj és a fémmag szerkezetébe, viszont a szintézis elején létrejövő

adduktumok kevésbé vizsgáltak. Ghosh és mtsai. tanulmányozták a LYZ és arany rendszer tulajdonságait, közvetlenül az Au(III) LYZ oldathoz adását követően ⁷¹. Eredményeik alapján a rendszerben különböző Au_n-LYZ (n = 1–8) adduktumok jöttek létre, ahol n növekedésével egyre nyíltabbá válik a LYZ szerkezete, és ez segíti a NC-mag kialakulását a fehérjén belül. Számítógépes elemzéssel megállapították, hogy a fehérje másodlagos szerkezete jelentősen megváltozik az Au bekötődését követően. A fehérje kitekerekedik, amit a diszulfidhidak felbomlása és a hidrogénkötések számának csökkenése idéz elő. A szerkezet az oldatfázisban relaxálódik a nagymértékű átalakulást követően. A LYZ elméleti számítások alapján nyolc Au-t képes megkötni, de a tömegspektrum alapján csak hét megkötését tudták bizonyítani. Ahhoz, hogy az Au-ionok beépüljenek a LYZ molekulába, szükséges a diszulfidhidak felszakadása, ami viszonylag nyílt fehérjeszerkezetet eredményez. Ezzel párhuzamosan a hidrogénhidakat kialakító aminosavak is távolabb kerülnek egymástól, ami még inkább a szerkezet kitekerekedéséhez vezet. Az oldatbeli kitekerekedés megértéséhez CD és IR spektrumokat is felvettek, és azt találták, hogy az Au(III)-koncentráció emelésével párhuzamosan csökken az α -hélix mennyisége a szerkezetben. A CD spektrumon az α -hélixre jellemző 222 nm-es csúcs egyre kisebb lett, a maximális aranytartalomnál a hélixeknek több mint 50 %-a eltűnt. FT-IR spektrumokon az amid csúcsok változása tükrözi a szerkezet megváltozását. Az amid I. csúcs (1650 cm⁻¹ körül) a C=O vegyértékrezgésből és a C-N síkon kívüli rezgésből származik ¹⁰⁷, és itt követhető le leginkább a szerkezet változása az α -hélix (1651–1658 cm⁻¹), β -redő (1618–1642 cm⁻¹), rendezetlen szerkezet (1640–1650 cm⁻¹) és β -kanyar elemeken (1666–1688 cm⁻¹). Az Au hatására az 1654 cm⁻¹ értéknél található csúcs közel megszűnt, ami alátámasztja a korábbi eredményeket. Az α -hélix körüli szerkezet megzavarása miatt a teljes szerkezet lazábbá válik. Elméleti számításokkal is vizsgálták, hogy mi történik a fehérje szerkezetével az Au fokozatos hozzáadásával. Az Au megjelenésével az α -hélix hozzájárulása fokozatosan csökkent 40 %-ról 28 %-ra, és a helikális szerkezet az Au⁺ megkötése után β -kanyarrá alakul.

2.8. A nanoklaszterek felhasználási területei

A NCs egyedi tulajdonságai számos új területen történő alkalmazást tesznek lehetővé, mint a katalízis, célzott hatóanyag-szállítás, fluoreszcens jelölés, fluoreszcens képalkotás, vagy a fluoreszcencia paramétereinek megváltozásán alapuló analitikai érzékelés ⁵⁷. A kétfémes, fehérjével stabilizált NCs egyedi, szerkezetükből adódó tulajdonságaiknak köszönhetően

kifejezetten eredményesen alkalmazhatók a fentebb megnevezett célokra. A fluoreszcencián alapuló felhasználásoknál (jelölés és képalkotás) a NCs leginkább más fluoreszcens anyagok, mint a szerves festékek és a kvantumpöttyök alternatíváinak tekinthetők. Habár a fluoreszcens festékek (pl. fluorescein, rodamin származékok) igen jó QY-kal rendelkeznek, alacsony fotostabilitásuk megnehezíti felhasználásukat (photobleaching, azaz a festékek kifakulása fotokémiai reakció hatására, az anyag emissziója idővel lecsökken vagy megszűnik). A kvantumpöttyök esetén magas QY és jó fotostabilitás jellemző, viszont az anyaguk miatt (pl. CdS, CdSe) megkérdőjelezhető biokompatibilitásuk (inkább citotoxikusak), és ez kételyeket vet fel alkalmazásukkal szemben. A NCs esetén előny a jó fotostabilitás, a kvantumpöttyökhöz képest kisebb méretük és a biokompatibilitás, amit a megfelelő ligandumok képesek biztosítani. Alacsony QY értékük azonban megnehezíti szélesebb körű felhasználásukat, ezért a NCs-re irányuló kutatások egyik fontos célja ennek növelése eltérő technikákkal. Lényeges a szintézis paramétereinek optimalizálása, hogy ezzel a legmagasabbra emeljük a termék fluoreszcenciáját, emellett fontos a jó ligandum kiválasztása is, ebben viszont a célzott alkalmazási terület korlátot szabhat. Egy másik jó módszer a NC fémmagjának ötvözése, azaz vegyes összetételű fémmag kialakítása.

A *fluoreszcens jelölés* előnyös módszer, mert nem invazív (nem igényli szövetek és szervek eltávolítását), emellett igen nagy az érzékenysége. Ezen a területen történő alkalmazás számos feltételt támaszt az alkalmazandó anyagokkal szemben. Előnyös, ha a fluoreszcencia a vörös-közeli infravörös (NIR) tartományba esik, mivel ennek nagy az áthatolási mélysége a szövetekben (azaz kicsi a szövetek elnyelése), minimális a fényszórás, illetve a szövetalkotók saját fluoreszcenciája által okozott interferencia is ⁵⁷. Összességében a nagy Stokes-eltolódás (kis átfedés az elnyelési és emissziós spektrumok között) megfelelő. Az *in vivo* alkalmazás fontos kitétele a rendszer biokompatibilitása, ami a felületi ligandumok helyes megválasztásával elérhető. Kifejezetten előnyösek ilyen szempontból a biomolekulák, ezek közül is a fehérjék, peptidek és a DNS, mivel ezek segítségével megfelelő optikai tulajdonságú részecskék állíthatók elő. Ezek az anyagok képesek bizonyos molekulákat szelektíven megkötni, ezért felhasználhatók célzott hatóanyag-szállításra, specifikus képalkotásra, fluoreszcens jelölésre és terápiás célokra is. Előnyös tulajdonság, ha a jelzéshez használt anyag magas kémiai és fotostabilitással rendelkezik, emellett fontos vizsgálni, hogy melyik sejtekhez, szövetekhez van nagy affinitásuk (azaz a szervezet mely részén képesek feldúsulni), illetve mennyire képesek a sejtekbe hatolni, továbbá mennyire ellenállóak a szervezetben a beadás helyétől a célterületig való eljutás során.

Az *analitikai érzékelés* területén már számos anyag, köztük nehézfémek, kismolekulák, de nagymolekulák és baktériumok kimutatására és meghatározására is használtak nemesfém NCs-et ⁵⁷. Az analitika területén történő alkalmazásuk sokrétűségét jelzi, hogy hőmérséklet és pH érzékelésre is használtak már fehérjével stabilizált kétfémes NCs-et ⁶⁹. Az érzékelés alapjául szolgáló folyamat is sokféle lehet: találunk példákat fluoreszcencia ^{28,30,42,65,108}, kemilumineszcencia ¹⁰⁹, elektrokémia ⁶⁷, felületerősített Raman-spektroszkópia (SERS) ¹¹⁰ alapú rendszerekre, de egyszerű vizuális érzékelésen alapuló teszt ¹¹¹ is létezik a szakirodalomban. Kifejezetten jelentősek azok a felhasználások, ahol biológiailag fontos molekulák kerültek meghatározásra, ill. környezetvédelmi megfontolások miatt a nehézfém ionok, peszticidek kimutatása is jelentős. A NCs előnye az érzékelés szempontjából hosszú élettartamuk, nagy Stokes-eltolódásuk, ligandumtól függően biokompatibilitásuk és szelektivitásuk. A minél nagyobb Stokes-eltolódás előnye, hogy a NCs emisszióját annál kevésbé zavarják a mátrixot alkotó anyagok, mivel ezek többsége az UV-kék tartományban fluoreszkál. A biokompatibilitás elengedhetetlen biológiai minták vizsgálata esetén, mivel az érzékelést befolyásolja a NCs interakciója a biológiai mátrix elemeivel. A szelektivitás alapvető elvárás érzékelési reakcióknál, hiszen az adott analit független kimutatása így biztosítható. Ha a NCs egyszerre több analittal is képesek reagálni, akkor biztosítani kell a vizsgált mintában, hogy csak az egyik analit legyen jelen, vagy pedig a zavaró anyagokat származékképzéssel kell inaktívvá tenni. Az előbbi megvalósulása környezeti és biológiai mintáknál igen valószínűtlen, míg az utóbbi bonyolultabb mintaelőkészítést és nagyobb költségeket jelent. A fluoreszcens érzékelés alapja az, hogy az érzékelő anyag fluoreszcencia sajátságai (pl. emissziós maximum, intenzitás, élettartam, esetleg polaritás) megváltoznak egy adott anyag jelenlétében, és ez a változás a vizsgált anyag koncentrációjával valamilyen függvény segítségével leírható. A leggyakoribb alkalmazásokban az intenzitás értékének változása a mért jel, ez lehet erősítés vagy kioltás. Az utóbbi esetén többféle mechanizmus képzelhető el, alapvetően statikus és dinamikus kioltásról beszélhetünk ¹¹². Statikus kioltás esetén a fluorofór egy nem fluoreszcens komplexet képez a vizsgált anyaggal. A fluorofórok száma tehát csökken az adott mintában, ezért csökken a mérhető intenzitás. Mivel a megmaradt fluorofórok esetén a fluoreszcencia folyamata nem változik, ezért a mérhető élettartam is azonos lesz. Dinamikus kioltásnál a gerjesztett állapotú fluorofór valamilyen ütközéses, nem sugárzásos folyamatban átadja a felesleges energiáját a vizsgált molekulának. A mechanizmus

A legfontosabb analitok a környezeti és biológiai minták esetén a nehézfémek^{42,101,113-115}, emellett a biológiai funkcióval rendelkező anyagok, például glükóz, vitaminok, gyógyszermolekulák is lehetnek. A kimutatás alapját sok esetben egy kötőhely-szubsztrát specifikus reakció adja. Mivel a kismolekulák között számos olyan vegyület található, melyek koncentrációjának ismerete elengedhetetlen, a meghatározásukra is sok NC-t vetettek be. A vizsgált molekulák között szerepel a dopamin¹⁰², szerotonin²⁸, húgysav⁹⁸, glükóz¹¹⁶, cisztein¹¹⁷, flavonoidok¹¹¹, biszfenol A⁶⁷, bilirubin¹¹⁸, aszkorbinsav⁷³, folsav³⁹, illetve a triptofán egyik lebomlási útvonalával, a kinurenin kör termékeivel kutatócsoportunk is foglalkozott^{46,119}.

[illegible]

34

Az enzimatis reakciók végterméke a nikotinamid-adenin dinukleotid (NAD⁺). Az útvonal köztes termékei képesek az idegi ingerületátvitel és immunválasz befolyásolására. Az antranilsav (AA) összefüggésbe hozható a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) citokin fehérje kifejeződésével és elnyomásával ¹²⁰. A kinurénsav (Kyna) elősegíti a kinurenáz A reakció lezajlását (a folyamatban az *L*-kinurenin – Kyn – alakul át AA-vá), ezzel csökkenti a 3-hidroxiantranilsav (3-HAA) és az AA arányát a szervezetben. Ez a vegyület gyulladáscsökkentőként szerepet játszik gyulladásos folyamatokban, így koncentrációjának követése és szabályozása kiemelt feladat lehet gyulladásos kórképek esetén. A 2-pikolinsav (PA) szerepe a Kyna-hoz hasonlóan meghatározó az idegrendszer védő folyamatokban, emellett a sejtnövekedés és sejtosztódás gátlásában ¹²¹. A kinurenin útvonal más molekulái, mint pl. a 3-hidroxi-*DL*-kinurenin (HKyn), a kinolinsav (QA) és a 3-HAA viszont neurotoxikusak (azaz az idegsejtekre méregként hatnak ¹²²). Az egyes vegyületek közötti egyensúly alapvetően meghatározza a neuronok működését és életképességét, képződésük erősen szabályozott folyamat, és jelentősen függ a személy élettani és kórtani állapotától. Az egyes anyagok képződésének, így koncentrációjának megváltozása neurodegeneratív betegségek, mint a Parkinson-kór, Alzheimer-kór, Huntington-kór vagy skizofrénia kialakulását jelezheti ^{122,123}. A HKyn lebomlása 3-HAA-vá egy kinurenináz enzim segítségével történik, ami további két enzimatis lépésben QA-vá alakul. A HKyn és a QA excitotoxikus hatással bírnak, azaz nagyon magas koncentrációjuk túlstimulálja az idegsejteket, receptorokat, sejthalált okozva. A HKyn mérgező hatása leginkább a szabadgyökök képzésével hozható összefüggésbe. A szerotonin fontos vegyület, szerepe neurotransmitterként jelentős; koncentrációjának változása többféle rendellenesség, szindróma kiváltó oka lehet ²⁸. A melatonin szerepe az alvási ciklus és vérnyomás szabályozásában kiemelkedő, és antioxidáns sajátsággal is rendelkezik ¹²⁴. A triptamin képes a szerotonin receptorok aktiválására, és származékait a migrén kezelésére tesztelték ^{125,126}.

A fenn említett biológiai folyamatok és hatásmechanizmusok miatt közel 10–15 éve kiemelt figyelmet kap idegtudományi kutatások terén a „kinurenin útvonal” molekuláinak a szervezeten belüli folyamatos monitorozása, akár gyors tesztek fejlesztése tekintetében is, ami közel 8 éve a kutatómunkánk egyik motivációját is adta az analitikai tesztek fejlesztése területén, s ami PhD munkám motivációját is részben érinti.

3. Célkitűzés

Kutatócsoportunk közel 8 éve foglalkozik fluoreszcens, egyfémű NCs előállításával⁵⁹ kis és makromolekulák felhasználása mellett^{39,59,63,72,115,127}. A munkák a NCs előállítására és jellemzésére^{58,59,63,72,127}, és azok felhasználására is fókuszálnak^{39,115}. Tanulmányaim megkezdésekor 2021-ben a csoportban kizárólag egy közlemény célozta meg kétfémű NCs előállítását³⁹, ahol adenzin-monofoszfáttal stabilizált Au/Ag NCs-et szintetizáltak, mely a folsav szelektív azonosítására mutatott ígértes eredményeket. A folsav mellett a triptofán metabolitok érzékelésére is fejlesztettek γ G-nal stabilizált Au NCs-et⁴⁶, melyről az *Irodalmi áttekintés* fejezetben már említést tettem.

Doktori munkám motivációja ezen említett munkákat^{39,46} követve olyan fehérjével stabilizált, de már kétfémű NCs előállítása volt, melyekre a szakirodalomban korábban nem volt példa. Minden esetben kiemelt cél volt arany/ezüst NCs kialakíthatóságának feltérképezése, ahol az alkalmazott fehérjék rendre a BSA, a LYZ, a γ G és a Tf voltak. A kísérletek során célom volt a kétfémű NCs előállítása, a szintézis megfelelő paramétereinek (fémek molaránya, fehérje és fém teljes koncentrációja, szintézis hőmérséklete és ideje) optimalizálása, illetve az újonnan szintetizált termékek minél egyszerűbb tisztítási protokolljainak kidolgozása. Céljaink között szerepelt a tisztított termékeket számos műszeres technikával jellemezni, meghatározva a NCs fizikai-kémiai tulajdonságait a teljes részecske, a fémmag és a fehérjeburok tekintetében is. Együttműködésben vizsgálni kívántuk a kialakított NCs biokompatibilitását is, ehhez antibakteriális hatást és citotoxicitást felderítő mérések eredményeit terveztük értelmezni. A kialakított rendszereket két alkalmazási területen volt célunk felhasználni, ezek a fluoreszcens jelölés és az analitikai érzékelés voltak. Az előbbinél a sejtek/szövetek jelölésére irányuló vizsgálatok helyett a szakirodalomban elsőként tűztük ki célul a fluoreszcens egy- és kétfémű NCs-et polisacharid alapú hatóanyag-hordozó NPs jelölésére alkalmazni. Az érzékelés területén folytatni terveztük a kinurenin útvonal molekuláinak kimutatására irányuló vizsgálatokat, célul tűzve ki egy analitikai tesztrendszer kialakítását a **14. ábrán** szemléltetett körfolyamat minél több molekulájára nézve. Méréseinket kiterjesztettük a szerotonin származékokra is. A kimutatási reakciókat több, biológiailag releváns közegben is terveztük elvégezni (foszfáttal pufferelt sóoldat, mesterséges gerincvelő folyadék és hígított emberi vészérum).

4. Felhasznált anyagok és vizsgálati módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

A NCs előállításához az alábbi anyagokat használtuk fel: marha szérum albumin (BSA, $\geq 90\%$, Sigma-Aldrich és $\geq 98\%$, hősokk frakció, zsírsav- és lényegében globulinmentes, Sigma); lizozim (LYZ, $\geq 90\%$, tojásfehérjéből, Sigma-Aldrich); gamma-globulin (γ G, szarvasmarhavérből, $> 99\%$, agaróz gélelektroforézis, Sigma-Aldrich és $M_w = 150000$ Da, SERVA Electrophoresis GmbH); humán apotranszferrin ($M_w = 76\text{--}81$ kDa, BioReagent, 98% agaróz gélelektroforézis, sejt kultúrához alkalmas, Sigma-Aldrich). Hidrogén-tetrakloro-aurát ($\text{HAuCl}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, $> 99,9\%$, Au-tartalom 49% , Alfa Aesar); ezüst-nitrát (AgNO_3 , $> 99\%$, Molar Chemicals); nátrium-hidroxid (NaOH , 99% , Molar Chemicals). A törzsoldatok elkészítéséhez ultratiszta Milli-Q vizet használtunk (Millipore, Direct-Q3 UV, fajlagos ellenállás $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 25°C -on).

A poliszacharid-alapú kolloid részecskék előállításához az alábbi anyagokat alkalmazzuk: Nagy molekulatömegű kitozán ($310\text{--}375$ kDa, $> 75\%$ deacetilezett, Sigma-Aldrich); hialuronsav Na-sója ($1,5\text{--}1,8 \times 10^6$ Da, $\leq 1\%$ fehérje, Sigma-Aldrich); nátrium-tripolifoszfát ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, BOD meghatározáshoz, Merck KGaA); ecetsav ($\geq 99,5\%$, Erdőkémia Co.). Hatóanyag kapszulázáshoz: $\pm$ - α - tokoferol ($\geq 96\%$, Sigma-Aldrich).

Az ionerősség és pH beállításához készített oldatok és pufferek valamint modell közegek összeállításához használt vegyszerek: nátrium-klorid (NaCl , 98% , Molar Chemicals); sósav ($37 \text{ m/m}\%$ -os oldat, Molar Chemicals); nátrium-dihidrogén-foszfát 2-hidrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 99% , Molar Chemicals); dinátrium-hidrogén-foszfát 12-hidrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 99% , Molar Chemicals); kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4 , 99% , Molar Chemicals); nátrium-hidrogén-karbonát (NaHCO_3 , 98% és $99,5\%$ Sigma-Aldrich); kálium-klorid (KCl , 96% , Molar Chemicals, és 99% , VWR); kalcium-klorid 2-hidrát ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 98% Molar Chemicals); magnézium-klorid 6-hidrát ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 99% , Molar Chemicals); *D*-glükóz-monohidrát ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$, 98% Molar Chemicals).

A kioltási reakciókhoz, analitikai tesztekhez használt vegyszerek az alábbiak voltak: kálium-jodid (KI , $> 99,9\%$, Molar Chemicals); *L*-triptofán (Trp, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7$, 98% , Merck), nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD, $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$, 97% , Merck). Sigma-Aldrich-tól beszerzett vegyszerek: kinurénsav (Kyna, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$, 98%); xanturénsav (XA, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_4$, 96%); *DL*-kinurenin (Kyn, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$, 98%); 3-hidroxi-*DL*-kinurenin (HKyn, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$, 98%); 3-hidroxi-antranilsav (AA, $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$, 97%); antranilsav (HAA,

C₇H₇NO₂, 98 %); pikolinsav (PA, C₆H₅NO₂, 99 %); kinolinsav (QA, C₇H₅NO₄, 99 %); 5-hidroxi-*L*-triptofán (HTrp, C₁₁H₁₂N₂O₇, 98 %); szerotonin (HTA, C₁₁H₁₂N₂O₇, 98 %); *N*-acetyl-szerotonin (ASer, C₁₁H₁₂N₂O₇, 98 %); melatonin (Mel, C₁₁H₁₂N₂O₇, 98 %); *L*-triptamin (TA, C₁₁H₁₂N₂O₇, 98 %).

4.2. Szintézisek

4.2.1. A nemesfém-alapú egyfémű NCs előállítási protokolljai

A disszertációban elkészített valamennyi egy- és kétfémű NC esetén a „templátos” eljárással történő előállítási protokollt alkalmaztuk, egyedi, az adott rendszerre fejlesztett kisebb-nagyobb módosításokkal. Az egyfémű rendszerek esetén főleg korábbi irodalmakat alapul véve, reprodukív szintézist végeztünk^{28,46,72,128}.

BSA-Au NCs: 15 mg BSA-t tartalmazó oldathoz ($V = 5,0$ ml) 510 μ l 0,01 M koncentrációjú HAuCl₄ oldatot adtunk, mely révén $c_{Au} = 0,93$ mM koncentrációt állítottunk be (fehérje-arany tömegarány = 15:1, $m_{Au} = 1,0$ mg). Az oldat 5 perces kevertetését követően a reakcióelegy pH-ját 1,0 M NaOH-oldattal pH = 12,0-re állítottuk be. A homogenizált mintát 24 órán át kevertetés nélkül $37 \pm 0,1$ °C-on tartottuk, ennek révén a minta kezdeti sárga színe világosbarnára változott. A 24 óra reakcióidő leteltével a vizes közegű diszperziót 14 kDa molekulatömeg elválasztási értékű cellulóz membránba helyeztük és 24 órán keresztül dializáltuk.

LYZ-Au NCs: Első lépésben 20 mg LYZ fehérjét oldottunk 5,0 ml Milli-Q vízben, majd annak oldódása után 510 μ l 0,01 M HAuCl₄ oldatot adtunk hozzá. A mintában az Au koncentrációja szintén 0,93 mM volt, míg a LYZ-Au tömegarány 20:1. A minta pH-ját 1 M NaOH oldattal pH = 12,0-re emeltük, majd a reakcióelegyet 24 órán át $37 \pm 0,1$ °C-on inkubáltuk, a NCs zavartalan képződésének elősegítése érdekében kevertetés nélkül. A fluoreszcens NCs-et ezután egy 14 kDa elválasztási értékű cellulóz membránnal dializáltuk, ahol a tisztítás időtartama 24 óra volt.

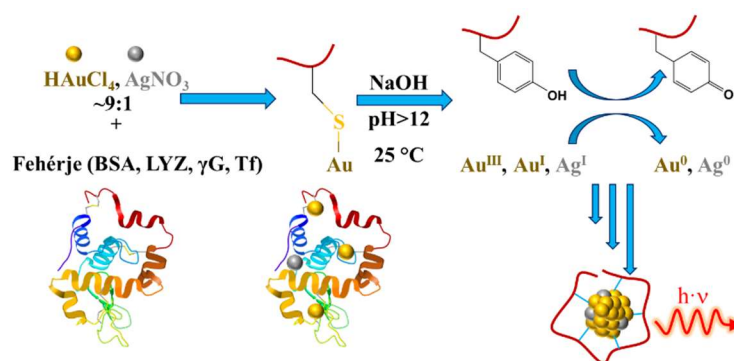
γ G-Au NCs: A γ G-nal stabilizált Au NCs előállítása némi módosítással egy korábbi, Kutatócsoportunk által kidolgozott eljárással történt⁴⁶. A szintézis kezdetén 15 mg γ G fehérjét oldottunk fel 5 ml Milli-Q vízben. Az oldódás biztosítása érdekében a fehérjeoldatot 2 órán át kevertettük. Az opálos fehérje diszperzióhoz ezután 510 μ l 10 mM koncentrációjú HAuCl₄ oldatot adagoltunk, majd 15 percig kevertettük a reakcióelegyet (fehérje-arany tömegarány = 15:1). A kiindulási [AuCl₄]⁻-ionok színe fokozatosan halványodott, jelezve a

fémionok megkötődését, ill. részleges redukcióját, ami a fehérje oldhatóságát szemmel láthatóan alig befolyásolta. A következő lépésben a korábban említett lúgos ($\text{pH} = 12,0$) közeg kialakítása érdekében $400\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ NaOH oldatot adtunk a reakcióelegyhez, melynek hatására megindult a fémionok Au^0 -vá történő redukciója. A lúg hozzáadását követően némileg erősödött a minta sárga színe, és néhány perc után az opálosodás is eltűnt, a minta már nem tartalmazott szilárd formájú anyagot. Rövid (5 perces) kevertetés után, ami a megfelelő homogenitást biztosította, a vizes mintát fénytől elzárva, keverés nélkül $37 \pm 0,1\ ^\circ\text{C}$ -on termosztáltuk. 24 óra eltelte után a minta sárgás-halványbarna színű lett, jelezve a NCs képződését. A terméket a BSA-Au NCs-hez hasonló módon és ideig, dialízissel tisztítottuk.

Tf-Au NCs: Az előállítást $1,5\ \text{mg}$ Tf $920\ \mu\text{l}$ Milli-Q vízben történő oldásával indítottuk. Rövid, 15 perces kevertetés után az oldathoz $80\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ HAuCl_4 oldatot adtunk (fehérje-arany tömegarány = 9,52:1). Kb. 5 perc elteltével a közeg pH -ját $1\ \text{M}$ NaOH -oldattal $\text{pH} = 12,0$ – $12,5$ tartományra állítottuk, aminek hatására megindult az Au(III)/Au(I) -ionok redukciója. A NCs képződése érdekében a mintát fénytől elzárva, kevertetés nélkül tároltuk $40 \pm 0,1\ ^\circ\text{C}$ -on. A mintát 24 óra inkubációs idő után szintén dialízissel tisztítottuk.

4.2.2. A nemesfém-alapú kétfémes NCs előállítási protokolljai

A kétfémes NCs esetén a 4.2.1. alfejezetben leírt protokollokat alkalmaztuk kisebb módosításokkal, és azzal a további kivétellel, hogy az aurationok mennyiségének egy részét (ez rendszerenként változó, 5–15 mol%-át) Ag^+ -re cseréltük. A kész NCs-ben a fémek mennyiségét és arányát ICP-MS mérésekkel határoztuk meg, mely pontos értékeket az 5. Eredmények és értékelésük fejezet foglal össze az adott rendszer jellemzése során. A szintézisek általános sémáját a 15. ábra foglalja össze, a leírásban a végső recepteket tüntetjük fel.



15. ábra: A fehérjével kivitelezett „templátos” eljárás folyamata a kétfémes NCs esetén

BSA-Au/Ag NCs: Elsőként 5,255 ml Milli-Q vízben 45 mg BSA-t oldottunk fel 15 perc kevertetés mellett, majd az oldathoz egymás után 230 μ l 10 mM HAuCl_4 oldatot és 25 μ l 10 mM AgNO_3 oldatot adtunk ($n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 9,2:1$). Öt perc kevertetés után a lúgos közeg kialakítása érdekében az oldathoz 370 μ l 1 M NaOH oldatot pipettáztunk. A reakcióelegyet 24 órán át szobahőmérsékleten, fénytől elzárva tartottuk a fluoreszcens NCs kialakulása érdekében. A reakcióelegyet ezután előre beáztatott cellulóz membránba töltöttük (vágási érték = 14 kDa) és 2×1 l vízben dializáltuk 2–2 órán keresztül. Az elkészült NCs-et tartalmazó vizes diszperziót további felhasználásig fénytől védve, hűtőszekrényben (+4 °C) tároltuk, maximum 1 napig.

LYZ-I-Au/Ag NCs: A LYZ felhasználásával két eltérő emissziójú terméket is készítettünk. Az (I) esetén első lépésben 15 perc kevertetés mellett 45 mg fehérjét oldottunk 5,255 ml Milli-Q vízben, és ezen oldathoz 217,5 μ l 10 mM HAuCl_4 -oldatot és 37,5 μ l 10 mM AgNO_3 -oldatot adagoltunk ($n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 5,8:1$). Az oldat színe a fémionok hozzáadása után halványsárgáról enyhe rózsaszínre változott. Következő lépésben 470 μ l 1 M NaOH-dal biztosítottuk a korábban is említett lúgos közegét, ezzel elindítottuk a fémionok redukcióját. Ennek hatására a fehérje egy pillanatra kicsapódott (amikor az oldat pH-ja elérte a LYZ i.e.p-ját), majd másodpercek után halványsárga színt mutatva ismét feloldódott. A mintát fénytől elzárva, keverés nélkül hagytuk 24 óráig. A terméket a BSA-Au/Ag NCs-nél említett módon, csak egy lépésben dializáltuk.

LYZ-II-Au/Ag NCs: A (II) termék esetén 60 mg fehérjét oldottunk fel 5,319 ml Milli-Q vízben, majd 15 perc után 180 μ l 10 mM HAuCl_4 -oldatot és 11,3 μ l 10 mM AgNO_3 -oldatot csepegtettünk a fehérje oldatához ($n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 15,9:1$). Az alacsonyabb fémkoncentráció miatt az oldat színének változása itt kevésbé volt szemmel látható. 5 perc kevertetés után 370 μ l NaOH oldattal a minta pH-ját pH = 12,0–12,5 állítottuk. 24 óra elteltével a fluoreszcens terméket dialízissal tisztítottuk.

γ G-Au/Ag NCs: Elsőként 5,319 ml Milli-Q vízben 90 mg γ G-t oldottunk (az oldódás csak részleges, a szilárd por oldódása/diszpergálódása 30 percet igényelt). Ehhez az elegyhez 174,5 μ l 10 mM HAuCl_4 oldatot és 17 μ l 10 mM AgNO_3 oldatot adtunk ($n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 10,3:1$). A fémionok hozzáadása után a minta jóval zavarosabb lett, de 15 perc után 400 μ L 1 M NaOH oldattal a minta pH-ját pH = 12,0–12,5 közé emeltük, ekkor feloldódtak a szilárd anyagok, és megindult a NCs képződése. A fluoreszcens termék kialakulása fénytől elzárva,

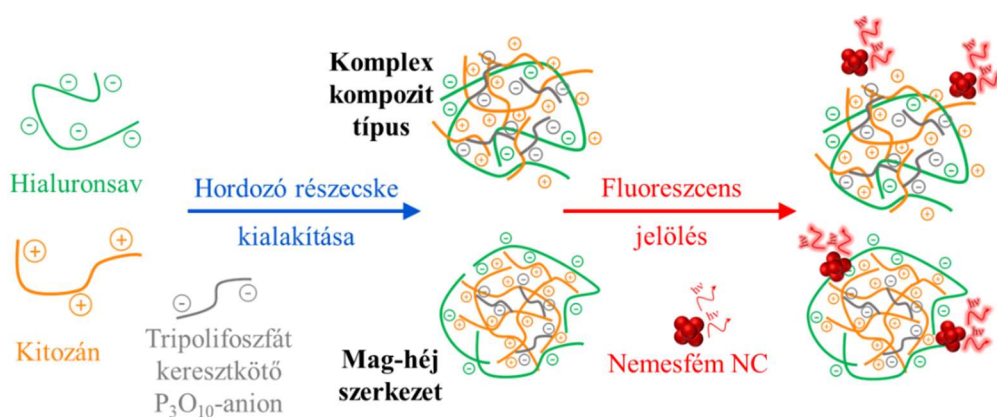
keverés nélkül történt 25 °C-on, 24 óra alatt. A terméket a BSA-Au/Ag NCs esetén leírt módon tisztítottuk és tároltuk.

Tf-Au/Ag NCs: A NCs előállításához 2,7 mg Tf-t oldottunk 480 µl Milli-Q vízben, és 15 perc oldódás után az aurát és ezüst fém sók 10 mM oldataiból rendre 17,9 és 2,1 µl-t adtunk a fehérje oldatához ($n_{Au}:n_{Ag} = 8,5:1$). Rövid kevertetés után 50 µl 1 M NaOH oldat hozzáadásával indítottuk el a NCs szintézisét (pH = 12,0–12,5), majd rövid homogenizálás után a mintát fénytől elzárva, kevertetés nélkül tároltuk 24 órán át. A könnyebb kezelhetőség érdekében az elkészült NC-minta térfogatát vízzel 2,3 ml-re egészítettük ki, majd 1,5 óráig dializáltuk 2×1 l Milli-Q vízben (cellulóz membránt alkalmazva).

Az egyes NCs tulajdonságainak meghatározásához minden esetben szilárd minták preparálására is szükség volt. A tisztított NCs-et tartalmazó vizes közegű diszperziókat folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk le (a minta csepegtetésével), majd a megszilárdult mintákat egy éjszakán át liofilizáltuk (Flexi-Dry™, FTS Systems®, Inc.).

4.2.3. Poliszacharid alapú kolloidális hatóanyag-hordozó részecskék kialakítása

A 4.2.1 és 4.2.2. fejezetben említett BSA- és LYZ-alapú NCs-et poliszacharidokból kialakított kolloid mérettartománnyal rendelkező, potenciálisan hatóanyag hordozóként funkcionáló részecskék fluoreszcens jelölésére kívántuk felhasználni. Ennek első lépéseként az említett hordozó részecskéket is ki kellett alakítani, itt kétféle, komplex kompozit és mag-héj szerkezetű hordozó részecskét is létrehoztunk. A kialakításuk és fluoreszcens jelölésük sematikus ábráját a **16. ábra** foglalja össze.



16. ábra: A poliszacharid-alapú kolloid részecskék kialakítási folyamata és a fluoreszcens jelölés kivitelezése a hordozó részecskék előállítását követően ^{129–131}

Kitozán-hialuronsav komplex kompozit típusú részecskék kialakítása: A poliszacharidokból felépülő összetett kolloid részecskék kialakítását egy korábban megjelent közleményünk ¹²⁹ alapján reprodukálva hajtottuk végre az ionos gélesedés módszerével. Elsőként a kitozán (Chit) és hialuronsav (HyA) törzsoldatokat 24 órával a felhasználás előtt készítettük el, a Chit koncentrációja 2 mg/ml, a HyA 0,615 mg/ml volt. A Chit törzsoldatot 2 V/V% ecetsav oldatban készítettük el, 24 óra duzzadási-oldódási időt biztosítva, míg a HyA-t azonos idő alatt tiszta Milli-Q vízben oldottuk fel. A Chit oldat pH-ját 2 V/V% ecetsav és 1 M nátrium-hidroxid felhasználásával 4,55–4,60-ra állítottuk. Ebben a lépésben 2,5 ml Chit oldathoz 2,5 ml ecetsavat és 875 µl NaOH oldatot adtunk, és ezután az oldatot 1 ml vízzel 0,727 mg/ml koncentrációra hígítottuk. Ezzel párhuzamosan a HyA törzsoldatot 15,4 µg/ml-re hígítottuk, és ebből 8,125 ml térfogatot 1,25 ml 2 mg/ml nátrium-tripolifoszfát (TPP) oldattal kevertünk össze. A kolloid részecskék elkészítéséhez 6,875 ml hígított Chit oldathoz egy lépésben adtuk hozzá a HyA-TPP keveréket, a minél jobb és gyorsabb homogenizálás érdekében erős kevertetést alkalmazva. A termékben a Chit-HyA tömegarány 40:1 lett, a módszer segítségével a rendszerben párhuzamosan alakultak ki a keresztkötések és a poliszacharid molekulák közötti elektrosztatikus kölcsönhatások. A kialakított hordozóként funkcionáló részecskéket centrifugálással tisztítottuk (12000 rpm, 10 perc), majd a további kísérletekhez a kiülepedett részecskéket Milli-Q vízben diszpergáltuk fel. A részecskék egyszerűsített szerkezete a **16. ábrán** látható.

Kitozán-hialuronsav mag-héj szerkezetű részecskék kialakítása: Ezen részecskék létrehozásához az előbbivel azonos koncentrációjú törzsoldatokat használtunk. Elsőként a „magot” képező TPP-vel keresztkötött Chit részecskéket készítettük el. Ehhez 6,875 ml puffert (pH = 4,55–4,60, ecetsav + NaOH segítségével beállítva) Chit oldathoz 1,25 ml TPP oldatot (2 mg/ml) adagoltuk lépésenként; egy lépésben erős kevertetés mellett 50 µl-t adtunk a TPP oldatából a Chit oldathoz, az egyes lépések között 5 másodperc szünetet tartva. Az utolsó adag hozzáadását követően a mintát még pár percig kevertettük, hogy a létrejött részecskék stabilizálódjanak. A HyA héj kialakításához az erősen kevertetett Chit-TPP mag szuszpenzióhoz egy lépésben 8,125 ml hígított HyA oldatot adagoltunk. Kétféle összetételű részecskét vizsgáltunk, az elsőnél 15,4 µg/ml HyA oldatot (a Chit-HyA tömegarány itt 40:1, azonos a komplex kompozit részecskékkel), míg a másodiknál 61,5 µg/ml oldatot használva (10:1 tömegarány). Az utolsó lépésben a negatív töltésű poliszacharid a pozitív részecskék felületén elektrosztatikus kölcsönhatások segítségével rögzült, de a részecskéket nem töltötte

át. A termékeket hasonló módon tisztítottuk, mint a kompozit részecskéket, sematikus szerkezetüket a **16. ábra** szemlélteti.

A kialakított hordozó részecskék fluoreszcens jelölése: A kísérletet kétféleképpen végeztük el: az első módszernél a jelöléshez használt, előre elkészített fluoreszcens NCs-et a poliszacharid részecskék kialakítása közben adtuk a mintákhoz, míg a másodiknál a már elkészített hordozó részecskék szuszpenziójához adtuk az Au NCs-et, kihasználva a létrejövő vonzó elektrosztatikus kölcsönhatást. A készítés során 1 ml poliszacharid részecske diszperziót 2 ml Milli-Q vízzel hígítottunk, majd ehhez erős kevertetés mellett adtuk hozzá a NCs megfelelő térfogatú és koncentrációjú diszperzióit, melyeket az **1. táblázatban** foglaltunk össze az adott NCs esetén.

1. táblázat: *A poliszacharid részecskéket tartalmazó vizes szuszpenziókhoz hozzáadott NCs-et tartalmazó vizes diszperziók koncentrációi és térfogatai az adott NCs esetén*^{130,131}

Részecske előállítás utáni jelölés				
	BSA-Au NCs	LYZ-Au NCs	BSA-Au/Ag NCs	LYZ-I-Au/AgNCs
c (mg/ml)	0,181	0,195	2,540	2,530
V(μl)	0–300	0–600	0–750	0–750
Részecske előállítás közbeni jelölés				
V(μl)	40, 80, 160	40, 80, 160	–	–

Az előállítás közbeni jelöléshez különböző mennyiségű (40, 80 és 160 μl) NC-diszperziót adagoltunk a keresztkötőt (TPP) tartalmazó oldatrészhez (TPP oldat a mag-héj vagy HyA + TPP keverék a komplex kompozit szerkezetnél). Komplex kompozit szerkezetnél 1 ml 2 mg/ml Chit oldathoz 1 ml 2 V/V%-os ecetsavat, 400 μl vizet és 375 μl 1,0 M NaOH oldatot adtunk, majd ehhez az oldathoz egyben adtuk hozzá a következő, párhuzamosan készített keveréket: 500 μl TPP, 40-80-160 μl Au NC diszperzió és 3,25 ml 2,5 vagy 10 % HyA oldat. Mag-héj szerkezetnél először a magot adó részecskét készítettük el: 1 ml 2 mg/ml Chit oldat, 1 ml 2 V/V%-os ecetsav, 400 μl víz és 375 μl 1,0 M NaOH oldat elegyítésével elkészítettük a puffereelt poliszacharid oldatot, majd ehhez egyben adtuk hozzá 500 μl TPP és 40-80-160 μl Au NC diszperzió elegyét. A kialakult részecskéket ezután erős kevertetés mellett 3,25 ml 2,5 vagy 10 % HyA oldathoz adtuk, létrehozva ezzel a héjat adó réteget. A jelölési reakciókat azonos paraméterek mellett tokoferolt tartalmazó mintákon is elvégeztük.

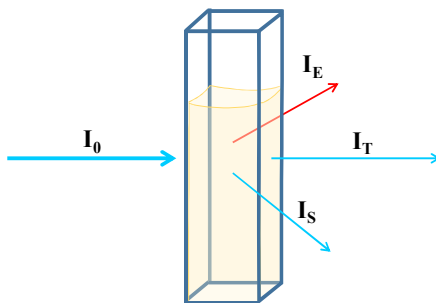
4.3. Vizsgálati módszerek

4.3.1 Optikai sajátságok meghatározásához alkalmazott műszerek

Ultraibolya és látható tartományban (UV-Vis) végzett spektrofotometriás mérések

Minden vegyületet magasabb energiaszintű állapotba lehet juttatni, azaz gerjeszteni. Ez lehetséges elektromágneses sugárzás (fény) segítségével is, az anyag elnyeli (abszorbeálja) a megfelelő energiával (frekvenciával) rendelkező fotonokat. Az ultraibolya és látható tartományban történő elnyelés hatására jellemzően az anyag vegyértékelektronjai kerülnek magasabb energiájú pályákra. Az elnyelt foton energiája arányos az alap és gerjesztett állapot közötti energiakülönbséggel, az energiaátmenetek kvantáltak (azaz nem minden energiájú foton nyelődik el). A fényelnyelés (abszorbancia) legfontosabb jellemzői az energia (rendszerint hullámhosszként $\{\lambda\}$ megadva) és az intenzitás (I), ami arányos az elnyelt fotonok számával. Az abszorbancia (A) az anyagra eső fényintenzitás (I_0) és az anyag által el nem nyelt fény (átbocsátott, azaz transzmittált I_T) intenzitásától függ a következő **12. egyenlet** szerint (**17. ábra**):

$$A = \lg \frac{I_0}{I_T} \quad (12)$$



17. ábra: A fény és anyag lehetséges kölcsönhatásai

Emellett az abszorbancia függ még az elnyelő anyag koncentrációjától (c) és az anyagban megtett távolságtól (optikai úthossz, l) is a jól ismert Lambert-Beer törvény szerint (**13. egyenlet**):

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (13)$$

Az ε az anyagra jellemző moláris abszorbancia (vagy másképp extinkciós koefficiens, kioltási együttható), mértékegysége $M^{-1}cm^{-1}$.

A NCs-et tartalmazó vizes diszperziók elnyelését Jasco V770 spektrofotométerrel határoztuk meg. A méréshez használt minták a szintézisek ismertetésénél leírt tisztítást követően három különböző koncentrációban kerültek mérésre: (1) a tisztítás utáni törzs (nem hígított) diszperzió, továbbá (2) 10-szeres és (3) 100-szoros hígítású minták (Milli-Q vízben). A minták elnyelési színeképét $\lambda = 200\text{--}800\text{ nm}$ tartományon vettük fel.

Fluorimetriás mérések

Ahogy az korábban említettük, az anyagokat lehetséges UV és látható tartományú fénnel gerjeszteni. Ez a gerjesztett állapot rövid időn belül képes a felesleges energiát leadni. Ennek módja lehet sugárzásmentes legerjesztődés, ilyenkor az anyag forgás és rezgés útján hőként adja le az energiát. Egy másik lehetőség, hogy a felesleges energia foton kibocsátásával távozik (I_E , **17. ábra**), ezt fotolumineszcenciának nevezzük. Ennek két típusa létezik attól függően, hogy milyen a gerjesztett állapotban az elektron spinje. Ha a kiindulási szingulett alapállapot (S_0) után a gerjesztett állapot is szingulett (S_1), akkor a legerjesztődéskor $S_1 \rightarrow S_0$ átmenet lesz, és fluoreszcencia történik. Ha a gerjesztett állapot kialakulásakor spinátfordulás történik, akkor a kialakult triplett (T_1) állapot legerjesztődésekor $T_1 \rightarrow S_0$ átmenet történik, ami tiltott átmenet. Ezt a jelenséget foszforeszcenciának nevezzük. Mivel a foszforeszcencia tiltott átmeneten alapszik, ezért ebben az esetben kisebb a folyamat lejátszódásának valószínűsége, így a gerjesztett állapot hosszabb ideig marad fent, élettartama megnő (jellemzően $10^{-6} - 10^0\text{ s}$), míg a fluoreszcencia megengedett átmenet, így élettartama is jóval rövidebb ($10^{-10} - 10^{-7}\text{ s}$). Az egyes elkészített NCs emissziós jellemzőit először egy Jobin Yvon FluoroMax-4 fluoriméterrel (Horiba, Retsch Technology GmbH, Haan, Németország) ellenőriztük. A mérések során $\lambda_{\text{gerj}} = 350\text{ nm}$ gerjesztési hullámhosszt és 3 nm résszélességet alkalmaztunk. A kész kétfémes NCs 3D fluoreszcencia spektrumát $\lambda_{\text{gerj}} = 200\text{--}500\text{ nm}$ gerjesztési és $\lambda_{\text{em}} = 210\text{--}800\text{ nm}$ emissziós tartományokon belül vettük fel. A kioltási kísérletekhez ezen a készüléken $3\text{--}3\text{ nm}$ résszélességet állítottunk be a NC, és $2\text{--}2\text{ nm}$ -t a fehérje mintákhoz. További mérésekhez egy Jasco FP-8500 fluorimétert is felhasználtunk, $2,5\text{ nm}$ -es résszélességeket alkalmazva mind a gerjesztési, mind az emissziós oldalakon (200 nm/perc mérési sebesség). Ezzel a készülékkel felvettünk 3D-spektrumokat is, ekkor a pásztázási sebesség 500 nm/min volt.

A *kvantumhasznosítás* (QY) azt méri, hogy milyen hatékonyságú a lumineszcens folyamat, azaz az anyagra bocsátott vagy az anyag által elnyelt fotonok mekkora része ad fluoreszcens vagy foszforeszcens fotont. A QY meghatározható fluoreszcens standardek

segítségével, ezek megválasztása attól függ, hogy milyen hullámhosszon emittál a vizsgált anyag. Kék tartományban jellemzően kinin-szulfátot, míg vörösben rodamin-B vagy 6G festéket alkalmaznak ^{66,73,112}. Egy másik lehetőség az integráló gömb és egy kalibrált fényforrás alkalmazása. Az integráló gömb egy belülről reflektív (közel teljesen fényvisszaverő) anyaggal bevont gömb, amiben a fényforrástól származó fotonok vagy elnyelődés nélkül a detektorba jutnak, vagy az elnyelést követően lumineszcens fotonként távoznak az anyagból, és szintén a detektorba érkeznek. Munkánk során az anyag ún. belső QY-át számítottuk ki, ehhez alapvetően két spektrum felvétele szükséges. Az első egy direkt gerjesztési spektrum, ahol a gerjesztő fényforrást közvetlenül a mintára irányítjuk, és mérjük az elnyelt és a lumineszcens fotonok intenzitását is. A második spektrumnál nem helyezünk mintát a gömbbe, ilyenkor az összes gerjesztő foton a gömbön belül szóródik, és elnyelés nélkül a detektorba jut. A detektor által szolgáltatott jelintenzitás (görbe alatti terület) arányos lesz a fotonok számával. A belső QY számításakor az elnyelt fotonokat vesszük figyelembe. A számítása az alábbi **14. egyenlet** szerint történik:

$$QY_{belső} = \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{elnyelt fotonok száma}} = \frac{E_1}{L_2 - L_1} \quad (14)$$

Itt E_1 az emissziós csúcs alatti terület (arányos a lumineszcens fotonok számával), L_2 a gerjesztési csúcs alatti terület minta hiányában (arányos a fényforrásból származó fotonok számával) és L_1 a gerjesztési csúcs alatti terület a minta behelyezésekor (arányos a minta által el nem nyelt fényforrásból származó fotonok számával). Ezek alapján $L_2 - L_1$ arányos lesz a minta által elnyelt (gerjesztő) fotonok számával. Ha a minta elnyelése alacsony a (abszorbanciája kisebb 0,1-nél), akkor lehetséges a minta szórt fotonok általi gerjesztése, ami torzítja a mérési eredményeket. Ennek jelentősége magas abszorbanciájú mintáknál elhanyagolható, viszont alacsony abszorbancia mellett hozzájárulása igen nagymértékű lehet. Ebben az esetben szükséges egy harmadik, korrekciós spektrum felvétele is, ekkor a mintát indirekt gerjesztjük, azaz a minta nem esik a gerjesztő fénysugár útjába, arra fotonok csak az integráló gömb falán történő visszaverődés után juthatnak. Ebben az esetben a számítás a következőképp változik (**15. egyenlet**):

$$QY_{belső} = \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{elnyelt fotonok száma}} = \frac{E'_1}{L_2 - L_1} \quad (15)$$

Itt E'_1 egy korrigált érték lesz (**16. egyenlet**):

$$E'_1 = E_1 - \frac{L_1}{L_3} E_3 \quad (16)$$

Ebben a **16. egyenletben** L_3 és E_3 az indirekt gerjesztésnél vett görbe alatti területek lesznek, amik rendre arányosak az el nem nyelt szórt fotonok és az elnyelt szórt fotonokból származó emittált fotonok számával.

Fluoreszcencia kvantumhasznosítás (QY) mérésekhez a Jasco készülék integráló gömbjét (Jasco ILF-835, átmérője 100 mm) használtuk, 3 mm-es apertúrát is beiktatva a fényútba. A spektrumokat a szoftver (ABL&E Jasco SpectraManager 2.0) segítségével értékeltük ki.

A *fluoreszcencia élettartamméréseket* a Horiba DeltaFlex időkorrelált egyedi fotonszámláló készülékkel (TCSPC) végeztük el. A mérésekhez 371 nm hullámhosszú impulzusüzemű lézert használtunk, a detektor oldalon a fényforrásból származó fotonok eltávolítására egy 400 nm-es szűrőt alkalmazva. A méréseket 50 kHz–8 MHz impulzusfrekvencia (és ehhez tartozó 100 ns–13 μ s időablak) mellett hajtottuk végre, a minták viszonylag alacsony emissziója (illetve kvantumhasznosítása) miatt 6, 8 és 12 nm résszélességet alkalmazva. A műszer válaszcélját (IRF) minden használt beállítás mellett felvettük, ennek célja a rövid élettartamok korrigálása volt (mivel a mérések tartalmazzák a valamilyen módon szóródott fotonokat is). Az IRF görbéket egy szilikagél szuszpenziót felhasználva mértük le. A mért görbéket a műszer saját kiértékelő programjával (EZTime) dolgoztuk fel, ahol az adatsorokat háromtagú exponenciális függvénnyel illesztettük meg, és az illesztések helyességét a kapott χ^2 értékek segítségével minősítettük. A kiértékeléshez használt multiexponenciális függvény általános egyenlete a következő volt (**17. egyenlet**):

$$y = a + \sum_{i=1}^n b_i * e^{-t/\tau_i} \quad (17)$$

ahol a egy konstans, b_i az i -edik preexponenciális tényező ($i = 1-3$), t az idő, τ_i pedig az i -edik fluoreszcencia élettartam. Ez a függvény $n = 3$ esetén a következőképp néz ki:

$$y = a + b_1 * e^{-t/\tau_1} + b_2 * e^{-t/\tau_2} + b_3 * e^{-t/\tau_3} \quad (18)$$

itt a **18. egyenletben** a megfelelő számmal (1–3) jelzett tagok az adott fluoreszcencia részfolyamathoz tartozó paraméterek. Az illesztésből nyert fontos paraméterek még a relatív amplitúdók (A_i (%)), amik megadják, hogy az adott mérési hullámhosszon milyen mértékben járulnak hozzá az emisszióhoz az egyes lumineszcens folyamatok. Ezeket a következő integrál (**19. egyenlet**) segítségével számolhatjuk ki:

$$A = \int_0^{\infty} a + \sum_{i=1}^n b_i * e^{-t/\tau_i} dt \quad (19)$$

(itt a 0 nem a mérés kezdetére vonatkozik, hanem arra az időpillanatra, amikor a gerjesztő fotonok a mintához érnek). Az A terület A_i részterületekre bontható, amikre igaz, hogy

$$A = \sum_{i=1}^n A_i \quad (20)$$

$$A_i = \int_0^{\infty} b_i * e^{-t/\tau_i} dt = b_i * \tau_i + C \quad (21)$$

ahol C egy konstans ($C \in \mathbb{R}$) az integrálás szabályait követve. A **20.** és **21. egyenletek** alapján az összegre a **22. egyenlet** felírható, miszerint

$$\begin{aligned} A &= \sum_{i=1}^n A_i = \int_0^{\infty} a + \sum_{i=1}^n b_n * e^{-t/\tau_n} dt = \\ &= \int_0^{\infty} a dt + \sum_{i=1}^n \int_0^{\infty} b_i * e^{-t/\tau_i} dt = \sum_{i=1}^n b_i * \tau_i + C \end{aligned} \quad (22)$$

Végül a relatív amplitúdók (**23. egyenlet**):

$$A_i(\%) = 100 * \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} = 100 * \frac{b_i * \tau_i}{\sum_{i=1}^n b_i * \tau_i} \quad (23)$$

4.3.2 A NCs jellemzéséhez alkalmazott műszerek

Induktívan csatolt plazma-tömegspektrometriás (ICP-MS) mérések

A tisztított kétfémes NCs pontos fémtartalmát, ill. elemösszetételét ICP-MS mérésekkel állapítottuk meg, ezeket a méréseket a SZTE Molekuláris és Analitikai Tanszékén Dr. Galbács Gábor csoportja végezte. A mintát előzetesen 1 órán át forró királyvízben kezelték a teljes fémtartalom feloldása végett. A mérésekhez egy kvadrupólus Agilent 7700X készüléket használtak, ami Agilent I-AS típusú automata mintavevővel, MicroMist mikroáramú koncentrikus pneumatikus porlasztóval és egy Peltier-hűtésű, Scott-féle spray-kamrával volt ellátva. A méréshez mátrix-korrigált többpontos kalibrációt használtak, IV-ICPMS-71C tanúsított kalibrációs standardet (Inorganic Ventures) alkalmazva, míg a plazma interfész paramétereit kalibráló standard oldatokkal (G1820-60410, Agilent) állították be. A fémek koncentrációjának meghatározásához Agilent Multi-Element Calibration Standard-3 és Inorganic Ventures IV-ICPMS-71A kalibrációs standardek is felhasználtak. A koncentrációkat az 50–60 $\mu\text{g/l}$ tartományban mérték meg, mintánként három párhuzamos mérést elvégezve, 5–6 %-os szórás (RSD) mellett. A mérési

eredményeket az Agilent Mass Hunter programmal értékelték ki és az eredményeket a rendelkezésünkre bocsátották.

SEM-EDX mérések

A fémek beazonosítása érdekében szilárd pormintákat vizsgáltunk SEM-EDX segítségével. A mintákról EDX spektrumokat rögzítettünk egy Hitachi S-4700 téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal, Röntec XFlash röntgen detektor segítségével, 25 kV gyorsítófeszültséget alkalmazva. A mérések ideje 180 másodperc volt, összesen 4096 detektorcsatorna alkalmazása mellett (a Fano-faktor értéke 0,10484 volt).

Transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) felvételek

Az elektronmikroszkópiák alapja, hogy az elektron nagy energiájának köszönhetően alacsony hullámhosszal rendelkezik, ami az elektron-anyag kölcsönhatás és képalkotás tekintetében nagy felbontást eredményez. A NCs méretét és morfológiáját felcseppentett mintákból határoztuk meg egy FEI Tecnai G2 20 X-Twin nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkóppal (Auroscience Kft, Budapest, Magyarország). A műszer 220 kV gyorsítófeszültség alkalmazása mellett működik, elektronforrásként egy fűtött W filamentet (mérete 100 μm) használva. A méréseket világos látótér (bright field) beállítással, különböző nagyítások mellett végeztük el, és a képek alapján ImageJ szoftverrel méreteloszlási diagramokat készítettünk, kb. 100 NC méretének a meghatározásával. A világos látóterű képalkotásnál a detektorból egy apertúra segítségével kizárjuk a diffraktálódott (szórt) elektronokat, ezzel lecsökkentve a zajt és kontrasztosabb képet kapva.

Röntgen fotoelektron spektroszkópiás (XPS) vizsgálatok

Az anyagok képesek a röntgensugárzás elnyelésére, aminek hatására (a reakció típusától függően) elektronok vagy fotonok léphetnek ki az anyagból. Az XPS esetén röntgen fotonokkal bombázzuk a mintát, aminek hatására törzselektronok lépnek ki a mélyebb pályákról. A kilépett elektron kinetikus energiája arányos lesz a gerjesztő foton energiájával és a kilépéshez szükséges energiával. Ez utóbbi az anyagra jellemző érték, emellett az oxidációs állapot is befolyásolja, hiszen az elektronsűrűségtől függően könnyebb vagy nehezebb az elektron kilépése. A fémek oxidációs állapotának megállapításához szükséges XPS méréseket Dr. Samu Gergely végezte. A mintákat egy SPECS készülékben mérte, ami egy PHOIBOS 150 MCD 9 félgömb analizátorral volt ellátva. A mintán feltérképező mérést végzett 40 eV átjutási energia (pass energy) mellett, majd a nagyfelbontású méréseket 20 eV

értékkel hajtotta végre. A töltés referencia a szén 1s csúcsa volt 284,80 eV-nál, és az Al K α röntgenforrást 200 W teljesítménnyel működtette. A kész spektrumokat a CasaXPS szoftverrel értékelte ki, és bocsátotta rendelkezésünkre.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás mérések

A királis molekulák eltérő mértékben képesek elnyelni a polarizált fényt. A CD spektroszkópia során a hullámhossz függvényében vesszük fel az ún. ellipticitás értékeket (mértékegysége általában m $^\circ$, a fok ezredrésze). Az ellipticitás (θ) egyszerűen a balra és jobbra forgató, cirkulárisan polarizált fényre mért abszorbananciák különbsége, szorozva egy korrekciós értékkel (**24. egyenlet**).

$$\theta = 32.98 * (A_{bal} - A_{jobb}) \quad (24)$$

Ebből származtatható a moláris ellipticitás ($[\theta]$), ennek mértékegysége történelmi okok miatt m $^\circ$ cm 2 /dmol. Számításához szükséges az optikai úthossz (cm) és a koncentráció (mol/cm 3) ismerete. Ha a vizsgált anyag fehérje, akkor annak átlagos aminosav molekulatömegével kell számolni a tömegkoncentráció (g/l) pontos ismerete mellett (az alkotó aminosavak molekulatömegének átlagát használjuk, mintha a fehérje az aminosavak közös oldata lenne).

A NCs-et stabilizáló fehérje másodlagos szerkezetének változását, illetve a NC-képződés fehérjékre gyakorolt hatását ezzel a technikával követhetjük. A mérésekhez egy ABL&E Jasco J-1100 CD spektrométert használtunk (ABL&E Jasco, Budapest, Magyarország). A mintát szobahőmérsékleten mértük egy 10 mm optikai úthosszú kvarc küvetában, a 190–300 nm-es hullámhossztartományban. A mintatartó teret a keletkező ózon eltávolítása végett folyamatosan N $_2$ -árammal öblítettük (3 l/perc). Az eredményeket a Jasco SpectraManager 2.0 Secondary Structure Estimation programmal értékeltük ki. Az elemzéshez mind a Yang-, mind a Reed-modellt alkalmaztuk; habár a Yang-modell megfelelőbb nagyobb molekulatömegű fehérjék vizsgálatára, a mi esetünkben a Reed-modell szolgáltatott kiértékelhető és pontosabb eredményt.

Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) vizsgálatok

A fehérje másodlagos szerkezetének változását FT-IR spektroszkópiával is vizsgálhatjuk. A méréseket két műszeren végeztük el: a BSA- és LYZ-Au/Ag NCs esetén egy BIO-RAD Digilab Division FTS-65 A/896 spektrométert alkalmaztunk egyszeri visszaverődéses gyémánt anyagú, csillapított teljes visszaverődéses (ATR) feltétellel (Harrick's Meridian® SplitPea). A további méréseket egy Jasco FT/IR-4700 készüléken végeztük el,

ami egy ATR PRO ONE egyszeri reflexiós feltétellel volt ellátva. A mérések kivitelezésében a csoportunkból Dr. Varga Norbert segédkezett. Az interferogramokat 500–4000 cm⁻¹ mérési tartományon rögzítettük, és 16 (ZnSe prizma), ill. 128 interferogram (gyémánt prizma) összegyűjtésével 1 cm⁻¹ felbontással nyertük a végleges spektrumokat. A méréseket a mintákból liofilizálással készített porokon, illetve a γ G fehérje esetén a tisztított NCs-vel azonos koncentrációjú és azonos pH értékű oldatából készített pormintán végeztük el.

Dinamikus fényszórás és zéta-potenciál mérések

A dinamikus fényszórás mérésének alapja a szórt fény intenzitásának időbeli fluktuációja. A diszpergált részecskék a Brown-mozgás következtében véletlenszerűen mozognak a közegben, és mozgásuk mértéke arányos lesz a részecske diffúziós együtthatójával. A kapott jel emellett függ még a részecskék méretétől is: a nagyobb részecskék lassabban mozognak. A mérés során egy szög (90 vagy 178°) mellett határozzuk meg a mintára jellemző autokorrelációs görbét. A kétfémes NC minták kinetikai állandóságát (kolloidstabilitását) a hidrodinamikai átmérő (d_H) és zéta-potenciál értékek változása alapján a pH = 1–12 tartományon értékeltük. A mérésekhez egy Malvern Nano ZS ZEN 4003 Zetasizer készüléket (PVT, Mosonmagyaróvár, Magyarország) alkalmaztunk 25±0,1 °C-on, amiben fényforrásként egy He-Ne lézer ($\lambda = 633$ nm) szolgált. A Tf-nel stabilizált NC minták optikai és kolloidstabilitását különböző körülmények mellett (pH és ionerősség) vizsgáltuk. Az ionerősség hatását 0–0,5 M NaCl oldatban, míg a pH hatását az 1–13 tartományban mértük dinamikus fényszórásmérés segítségével. A jelölési reakció jellemzése céljából vizsgáltuk a hordozó részecskék, illetve a már jelölt rendszerek méretét, méreteloszlását és zéta-potenciálját is. Ehhez a Horiba SZ-100 NanoParticle Analyzer készülékét (Retsch GmbH, Haan, Németország) használtuk. A hordozó-NC rendszerek semlegesítési pontjának meghatározásához 1 ml hordozó szuszpenziót először 3 ml-re hígítottunk, majd különböző mennyiségű BSA- vagy LYZ-Au NC diszperziót adtunk az egyes mintákhoz. Ezzel sikerült a teljes tartomány (azaz a semlegesítési pont előtti és utáni szakasz) lefedése. A hat különböző titrálást (3 hordozó titrálva 2 NC-rel) további DLS és zéta-potenciál mérésekkel vizsgáltuk, és a semlegesítési pontot nemlineáris regresszió segítségével határoztuk meg, a hat paraméteres Boltzmann egyenletet (25. egyenlet) felhasználva ¹³²:

$$\zeta = \frac{A_1 x + A_2}{1 + \exp[(x - A_4)/A_3]} + A_5 x + A_6 \quad (25)$$

Az egyenletben szereplő A_1 - A_6 illesztési paraméterek. Mivel az illesztés $x = 0$ közelében értékelhetetlen eredményt adott a 40:1 Chit-HyA komplex kompozit- LYZ-Au NC esetben, itt a négy paraméteres egyenletet kellett alkalmaznunk (26. egyenlet, ¹³³):

$$\zeta = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \exp((x - A_4)/A_3)} \quad (26)$$

Ebben A_2 a felső határérték, A_1 az alsó határérték, A_3 az inflexiós pont x értéke (A_2 és A_1 közötti felezőpont) és A_4 az y értékek különbsége az A_2 és A_1 pontok között. Az illesztések elvégzése után az egyes titrálásoknál összehasonlítottuk az inflexiós pontokat.

Áramlási potenciál mérésén alapuló töltésmeghatározás

Az áramlási potenciál ($U_{\text{áram}}$) mérésének alapja, hogy mechanikai nyomáskülönbség hatására egy töltéssel rendelkező felület és egy elektrolitoldat között potenciál (feszültség) jön létre. A mérés fizikai hátterében az áll, hogy a felületi töltést egy elektromos kettősréteg kompenzálja az elektrolit oldatban. A közeg áramlásával ezek a töltések is elmozdulnak, így áramot (áramlási áramerősség, $I_{\text{áram}}$) mérhetünk. Jól meghatározott geometriájú mérési elrendezésben két elektródót helyeznek el, és közöttük ismert nyomáskülönbséget alakítanak ki. Egyensúlyi állapotban az $U_{\text{áram}}$ és a zéta-potenciál között az alábbi összefüggés írható fel (27. egyenlet):

$$U_{\text{áram}} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta \kappa_l} \Delta p \quad (27)$$

Az egyenletben ε_r a közeg relatív permittivitása, ε_0 a vákuum permittivitása, ζ a zéta-potenciál, η a közeg viszkozitása, κ_l a közeg fajlagos vezetése és Δp a kialakított nyomáskülönbség. Ez az egyenlet viszont feltételekhez kötött:

- az elektromos kettősréteg nem túl vastag ($\kappa R \gg 1$, hasonlóan a ζ elektroforetikus mobilitásból $\{u\}$ történő számításához a Schmolukowski-modell esetén)
- nincs felületi vezetés
- nincs elektromos kettősréteg polarizáció
- a felület homogén
- a geometria hengeres
- nincs az áramlás tengelye mentén koncentráció gradiens

Az áramlási potenciál értékeknek a pH módosításával bekövetkező változását a fehérje és a kétfémes NCs esetében egy Mütek PCD 04 részecske töltés titrátorral követtük. A kiindulási

térfogat 20 ml volt, a fehérje koncentrációja a mintákban 2,54 mg/ml volt, míg a mérési pontokat 0,5 pH-egységenként vettük fel.

Izoterm titrációs kalorimetriás (ITC) mérések

Az ITC mérések célja a Tf és a 3-HAA közötti kölcsönhatás megállapítása volt. A mérésekhez, melyeknél Dr. Juhász Ádám segédkezett, egy VP-ITC mikrokcalorimétert használtunk (MicroCal Inc, Northampton, MA, USA). A buborékképződés elkerülése érdekében az elkészített mérőoldatokat a kísérletek megkezdése előtt ultrahangos kádban 10 percig gázmentesítettük. A mérések közben a mérőcellát 25 °C-on termosztáltuk és 240 rpm sebességgel kevertettük. Egy kísérlet során 1,4 ml Tf oldathoz 250 µl 3-HAA oldatot adagoltunk 10 µl-es adagokban, 25 lépésben. Minden adagolás legalább 20 másodpercig tartott, és az egyes lépések között 200 másodperc szünetet hagytunk a reakció teljes lejátszódása (és az egyes csúcsok elhatárolása) érdekében. A hígulási hozzájárulások figyelembe vétele érdekében referenciatitrálásokat is végeztünk vakoldatok segítségével, az eredeti mérésekkel azonos körülményeket tartva (pontosabban 1,4 ml PBS mátrixhoz adtunk 350 µl 3-HAA oldatot). A NC minták esetében azonosan jártunk el, csak a fehérje helyett a NC diszperzió került a mintatartó térbe, azonos fehérjekoncentráció beállítása után.

Ciklikus voltammetriás (CV) mérések

A γ G-nal stabilizált Au és Au/Ag NCs elektrokémiai jellemzőit CV mérésekkel Dr. Ungor Ditta vizsgálta, amikhez egy Metrohm DropSense µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat műszert használt. Az elektrokémiai cellában egy Metrohm által készített szitanyomott szénelektrodát (SPCE) használt, amiben a munka- és ellenelektrod egy szénfilm volt, és egy AgCl/Ag másodfajú elektrod szolgált referenciaként. A méréseket 25 °C-on végezte el 0,1 M KCl háttélektrolit mellett, 50 mV/s pásztázási sebességet alkalmazva. A vizsgált potenciálablak -0,4 és +1,0 V közötti volt.

Fluoreszcens mikroszkópiás felvételek

A fluoreszcens rendszerek morfológiáját, emissziós intenzitását és eloszlását Leica DM IL LED invertált laboratóriumi mikroszkóppal vizsgáltuk. Ehhez a méréshez a mintákat egy egyedi nyomdázási eljárással vittük fel a tárgylemezre. A kiválasztott minta tárgylemezre cseppentése után egy szövetdarabot helyeztünk a mintára, így a jelölt részecskék vagy

aggregátumok száradás közben a szálak közötti résekben gyűltek össze, ezáltal a tárgylemez adott pontjain lokálisan felerősítve az emissziót.

4.3.3 Szenzorikai vizsgálatok

A triptofán aminosav kinurenin és szerotonin bomlási útvonaláról származó vegyületei és a NCs közötti kölcsönhatást azonos moláris koncentráció mellett, különböző háttérolatokban (PBS és aCSF) vizsgáltuk. Egy mintában 250 µl NC szuszpenziót, 86 µl 1 mM neuroaktív anyag oldatot (1:3,96 fém-vizsgált molekula, illetve 1:23,3 fehérje-vizsgált molekula molarány) és PBS puffert elegyítettünk (össztérfogat 2,5 ml). A neuroaktív anyagok oldatait mindig frissen, azok szilárd formában történő bemérésével, majd a megfelelő háttérközegben történő feloldásával készítettük. A 3-HAA-nál további minták is készültek a kimutatási határ (LOD) meghatározása céljából, itt a hozzáadott térfogatot (10–200 µl) és a törzsoldat koncentrációját (0,01–0,1 mM) változtattuk.

4.3.4 Biológiai vizsgálatok

Az egyes NCs citotoxicitási és antibakteriális hatás vizsgálatait a SZTE SZAOK Orvosi Mikrobiológiai Intézetében végezték el. Mivel e méréseket nem közvetlenül mi végeztük, a méréseket sem láttuk, így azok leírását és a mérések során felhasznált anyagokat a *Függelék* tartalmazza.

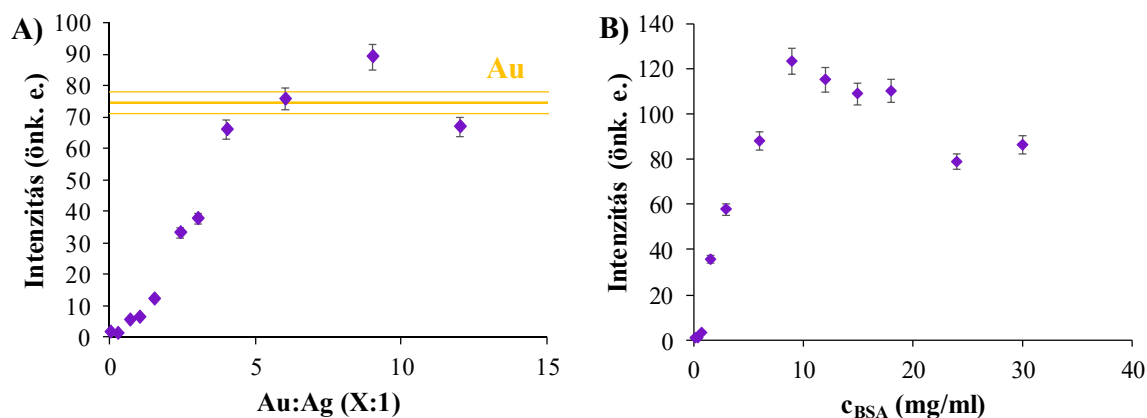
5. Eredmények és értékelésük

5.1. BSA-nal stabilizált egy- és kétfémes NCs

5.1.1. Az előállítási protokollok kidolgozása

A BSA-t korábban már eredményesen használták több kétfémes NC előállítására, pl. Au/Cu⁶⁷, Au/Pt¹³⁴, Au/Cd¹³⁵, Au/Gd¹³⁶ és Cu/Zn¹⁰⁹, természetesen az Au/Ag^{20,30,69,105,113,114,117} mellett. Fontos megjegyezni, hogy az említett rendszerekben a fémionok sokszor nincsenek kapcsolatban egymással¹³⁶, inkább egy hibrid rendszer részei, illetve a második fém nem minden esetben nulla oxidációs állapotú. Ezek az észrevételek rámutatnak arra, hogy a kétfémes NC kifejezés egy tágan értelmezett fogalom a szakirodalomban. A disszertációban az előállított kétfémes rendszerekben minden esetben azokat tekintjük kétfémes NCs-nek, ahol a két fém a NCs magjában található. A doktori munkában ezért egy korábban megjelent kutatócsoporti BSA-Au NCs kialakítására alkalmas receptet használtunk elsőként az egyfémes NCs reprodukív előállítására (ezt a szintézist jelen doktori disszertációban nem részletezzük, csak az 5.1.2. fejezetben a termék, mint referencia, jellemzését mutatjuk be röviden), majd a kétfémes származékok előállítására is, de ez esetben a protokoll kismértékű továbbfejlesztésével¹³⁰.

Az optimális reakcióparaméterek megtalálásához első lépésben a fémionok ($[\text{AuCl}_4]^-$ és Ag^+) reakcióját vizsgáltuk a BSA-nal *eltérő összetételek* kialakítása révén 40 °C-on, pH = 12 mellett, mely kísérlet eredménye a **18. A) ábrán** látható.



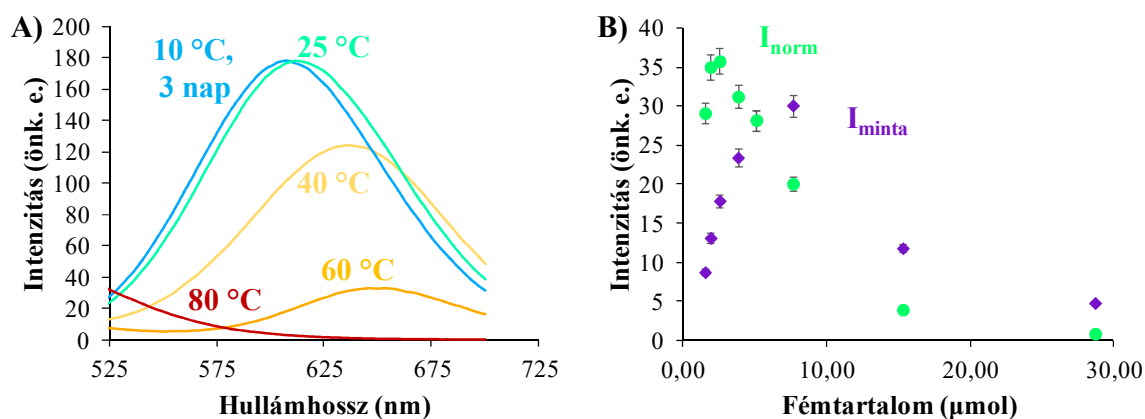
18. ábra: A) Az Au/Ag molarány és B) a fehérjekoncentráció hatása a BSA-Au/Ag NCs emissziós tulajdonságaira (A: $c_{\text{BSA}} = 15 \text{ mg oldva } \{5,88 \text{ ml mintában}\}$, $n_{\text{fémion}} = 5,10 \mu\text{mol}$, B: $n_{\text{fémion}} = 5,10 \mu\text{mol}$, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 9,2:1$, pH = 12, $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{gerj}} = 365 \text{ nm}$)¹³¹

A fémionok arányát folyamatosan cseréltük a teljes Au- és Ag-tartalom között, 15 mg fehérje/5,10 μmol fémion arány tartása mellett (ez tiszta Au esetén 15:1 fehérje-Au tömegarányt is jelentett). A fehérje-fém adduktumok képződésekor megváltozott a minták színe, a kezdeti sárga szín kissé narancssárga lesz (Au-tartalom függvényében), illetve opálosodás is lehetséges magasabb Ag-tartalomnál, amit nem oldódó vegyületek képződése (pl. AgCl) okozhat. Az Ag-tartalmú csapadékok létrejöhetnek a fehérje töltött csoportjaihoz tartozó ellenionokkal, vagy a $[\text{AuCl}_4]^-$ ligandumcseréjekor felszabaduló kloridionokkal. A fémioncsere hatását az Au NCs emissziós maximumának eltolódásával, illetve az intenzitás megváltozása alapján értelmeztük. Az alacsony, 5–15 m/m% ezüsttartalom hatására az emissziós maximum értéke 660 nm-ről 630–640 nm-re tolódik, ami a minták által UV-fény alatt kibocsátott fény színén is észlelhető. A jelenséget a szakirodalomban is megtalálhatjuk hasonló rendszereknél ¹³⁷. A fémmag összetételének változása jelentősen képes változtatni a NCs optikai tulajdonságait, amit korábbi publikációkban is leírtak ^{30,69,105}. Ilyen esetekben az ezüsttartalom kezdeti emelése az emissziós csúcs kékeltolódásával jár, amit a HOMO-LUMO átmenet (HOMO: legmagasabb energiájú betöltött molekulapálya, LUMO: legalacsonyabb energiájú be nem töltött molekulapálya) energiájának növekedésével magyarázhatunk. Az Ag-ionok megjelenése megváltoztatja a LUMO eredeti összetételét, amit Au esetén annak 6s- és 6p-pályái alkotnak. Az Au pályáihoz képest magasabb energiájú Ag 5s-pálya megjelenésével megnő a LUMO energiája, ezáltal szélesebb lesz a HOMO-LUMO távolság, ami esetünkben narancsvörös tartományú emissziót eredményez. Jóval magasabb Ag-tartalom mellett a λ_{max} értéke egészen 730 nm-ig tolódik el, intenzitása meglehetősen alacsony, mivel a minta sárgásbarna színe alapján inkább Ag NPs képződnek. A minták színe egyébként is árulkodik a kialakuló NCs minőségéről. A tiszta Au NCs színe rózsaszín-barna, míg kis Ag-tartalom is halványsárgává módosítja őket. Nagyobb Ag-tartalom mellett, ahol az emisszió már igen gyenge, a szín az Ag NPs-re jellemző. Ezek a részecskék feltételezhetően nem plazmonikusak, mivel hiányzik a jellemző élénksárga szín (ehhez kapcsolódó UV-Vis fotometriás mérés nem készült), inkább kisméretű, a NP és NC közötti állapot feltételezhető. A jelenség annak tudható be, hogy az Ag^+ -ionok affinitása nem elég nagy a fehérjéhez, ezt jelzi az is, hogy ezüsttartalmú csapadékok keletkeznek a NaOH hozzáadása előtt. A teljes összetétel-tartományban kizárható az egyedi Au és Ag NCs egyszerű keverékének kialakulása is, mivel a termék emissziója (630–640 nm) nem az összege az Au (660 nm) és az Ag NCs (730 nm) emissziós sávjának. A legmagasabb

intenzitást 95 % – 5 % (9,2:1 mólarány, **18. A) ábra**) Au-Ag tömegösszetételnél kaptuk, így ezt a kombinációt alkalmaztuk a további méréseknél.

A következő kísérletsorozatban a fehérjekoncentráció hatását vizsgáltuk (**18. B) ábra**). Korábbi, LYZ-mal végzett munkából ismert, hogy alacsonyabb fehérje:fém tömegarányok alkalmazása a nagyobb méretű, plazmonikus NPs kialakulásának kedvez⁷². Az egyes minták fehérjetartalmát az 1–150 mg (~ 0,2–30 mg/ml) értékek között változtattuk (BSA-Au-Ag tömegarány 1,1:1,0:0,06–165,6:1,0:0,06 közötti volt) az Au-Ag arány (9,2:1) megtartása mellett. A minták színe alacsony BSA-tartalomnál lila volt, ami jelezte a plazmonikus Au vagy Au/Ag NPs kialakulását. Még ezeken a mintákon belül is megfigyelhető volt a szín változása (1 mg BSA mellett lilább a termék, mint 4 mg-nál), a nagyobb mennyiségű fehérje kisebb méretű NPs kialakulását eredményezte. Megfelelő BSA többlet esetén (8,8:1,0:0,06, 8 mg BSA) a minta színe sárgásra változott, ami jellemző a fluoreszcens sajátságú NCs-re. Már a 4 mg fehérjét tartalmazó mintában is észlelhető némi vörös emisszió, ami szélesebb méreteloszlást feltételez a mintán belül. A fehérjekoncentráció növeléssel a minták emissziós intenzitása folyamatosan emelkedett a 49,7:1,0:0,06 BSA-Au-Ag arányig (45 mg fehérje), innentől kezdve viszont további fehérje adagolása már csökkentette az intenzitást. Ennek megfelelően a maximális értékhez tartozó BSA-koncentrációt (9 mg BSA oldva 5,88 ml mintában) használtuk a további kísérletekhez.

A szintézis hőmérsékletének tanulmányozása során az egyes mintákat eltérő hőmérsékleten (10, 25, 40, 60 és 80 °C) is előállítottuk (**19. A) ábra**).



19. ábra: A) A hőmérséklet hatása a BSA-Au/Ag NCs kialakulására ($pH = 12$, $c_{BSA} = 45 \text{ mg } \{5,88 \text{ ml-ben}\}$, $n_{fémion} = 5,10 \text{ } \mu\text{mol}$, $n_{Au:nAg} = 9,2:1$, $\lambda_{gerj} = 365 \text{ nm}$). B) A fém tartalom hatása a kétfémes NCs-re ($pH = 12$, $c_{BSA} = 45 \text{ mg } \{5,88 \text{ ml-ben}\}$, $n_{fémion} = 1,53\text{--}28,69 \text{ } \mu\text{mol}$, $n_{Au:nAg} = 9,2:1$, $T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\lambda_{gerj} = 365 \text{ nm}$). I_{minta} = a minta emissziós intenzitása, I_{norm} = a fém tartalomra normalizált intenzitás¹³¹

A BSA-Au NCs esetén jól ismert, hogy a 37–40 °C-on kivitelezett szintézis az ideális ²¹. A **19. A) ábrán** látható emissziós spektrumok alapján a 40 °C feletti előállítás már nem kedvez a kétfémes NCs kialakulásának, feltételezhetően a fehérje denaturációja miatt, ami zavarhatja az Ag beépülését. A hőmérséklet emelésével a minta színe egyre sötétebb lett, az emisszió értéke a nagyobb hullámhosszak felé tolódott és egyre inkább lecsökkent az intenzitása. A 80 °C-on elkészített minta végül nem is tartalmazott vörösen emittáló részecskéket. A 60 és 80 °C-on előállított mintákban szabad szemmel látható volt a fehérje aggregációja. A hőmérséklet csökkentése, szemben a növeléssel, mintegy 50 %-kal megnövelte a fluoreszcencia intenzitás értékét, illetve az emissziós csúcsot 621 nm-re el is tolt. A hőmérsékletcsökkentés a minták színére szintén hatással volt: minél alacsonyabb hőfokon készült a minta, annál halványabb volt a színe. A 10 °C-os mintánál, ahol 3 nap eltelté után is készült mérés, a minta színe (részben a szobahőmérsékleten eltöltött idő miatt) sötétedett, ami egyértelműen utólagos NC-képződést jelzett. Itt az emissziós intenzitás tekintetében a szobahőmérsékletű mintához igen hasonló eredmények érhetők el, viszont ehhez háromszor annyi idő (72 h) volt szükséges. A termékénél $\lambda_{\max}$ valamivel alacsonyabban van, de ezen kívül a megnövelt szintézisidő figyelembevételével a szobahőmérsékletű előállítást preferáltuk a további szakaszban.

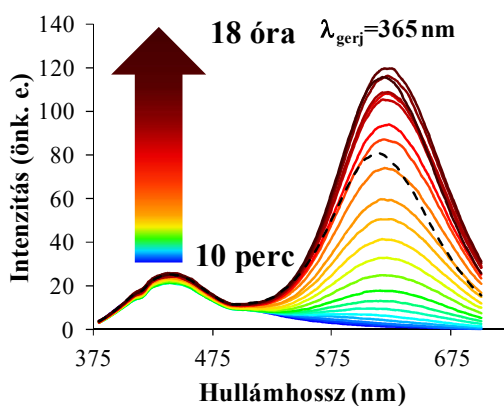
A *fémkoncentráció hatásának* tanulmányozása során a fémtartalmat az eredetihez képest 0,30–5,625-szeres koncentrációkra állítottuk be (**19. B) ábra**), az Au-Ag 95 %–5 % megtartása mellett. A kész minták színe változott a fémek mennyiségével, intenzívebb sárga-narancssárga színt nyertünk magasabb, halványsárga színt alacsonyabb fémtartalom mellett. Különbség mutatkozott már az adduktumképzés szakaszában is, ami abból adódhatott, hogy magas fémtartalom mellett nem minden ion volt képes adduktumot képezni a fehérjével. Alacsonyabb fémmennyiségeknél komolyabb színváltozás látszik, az Au(III) színe közel teljesen eltűnik, és elegendő idő után opálosodás is jelentkezhet, ami nagy valószínűséggel a kialakult szerkezet instabilitását jelzi. Korábbi, többfunkciós tiolvegységekkel végzett mérések azt mutatták, hogy attól függően, hogy a fémionokkal komplexet (adduktumot) képző tiol molekulában van-e más, töltéssel rendelkező csoport (pl. COO^- vagy NH_3^+), a képződő komplex oldhatósága változik, emellett a pH-tól függően az ionizáció mértéke is befolyásolja a komplex töltését ⁵⁷. Pusztán a minták intenzitását vizsgálva a másfélszeres fémkoncentrációnál nyerünk közel azonos, vagy valamivel magasabb értéket, minden másik mintánál alacsonyabb a beütésszám. Az 5,10 μmol fémnél nagyobb fémtartalmú mintákat hígítás mellett is mértük, a fém mennyiségét ezeknél 5,10 μmol -ra állítottuk a mérésekhez,

mert az UV-lámpa alatt készült fényképek azt sejtették, hogy a fluoreszcencia egy részét a minta elnyeli ¹¹². A végső összehasonlítás érdekében a mért beütésszámokat a fémtartalommal normalizáltuk, hiszen az emisszió a NCs-től érkezett; ekkor azt találtuk, hogy feleakkora fémmennyiség (2,55 μmol) ad maximális értéket, igen hasonló értékeket szolgáltatva a közeli koncentrációkon is.

A BSA-Au/Ag NCs-nél vizsgáltuk a *hozzáadott NaOH mennyiségének*, ezzel egy szűk, erősen lúgos tartományban a pH-nak a hatását is. A mérések alapján szükséges egy viszonylag magas pH biztosítása, ugyanis monoton emelkedés volt tapasztalható a mérhető intenzitásokban, majd telítést tapasztaltunk az értékekben. A folyamat alacsonyabb pH-n lassabb, mert a Tyr redukáló ereje csökken a pH-val. Ennek megfelelően azt az értéket választottuk (470 μl), ahol biztosított volt a maximális emisszió kialakulása.

Gyakorlati szempontból ellenőriztük, hogy milyen hatással van a *fehérje oldódási ideje* a termékek minőségére. Mivel a kiindulási 60 perces oldási időt soknak gondoltuk, így 15, 30 és 45 perc mellett is megkíséreltük a szintézisek végrehajtását. Az eredmények alapján az oldási idő nincs hatással a termék optikai tulajdonságaira, azaz a legrövidebb, 15 perces kevertetés is elegendő a fehérjének a megfelelő oldatbeli térszerkezet felvételére.

A *reakcióidő* hatását vizsgálva eleinte 15, majd 30 perces, végül egy órás időközönként rögzítettük a reakcióelegy emissziós spektrumait, melyeket a **20. ábrán** gyűjtöttünk össze.



20. ábra: A szintézisidő hatása 0–24 óra tartományban a BSA-Au/Ag NCs emissziós színekére az optimalizált paraméterek mellett (szaggatott vonal: 24 óra) ¹³¹

A 16 órás méréshez párhuzamos mintákat készítettünk, illetve 24 óra eltelte után is felvettük a spektrumokat. A tapasztalatok alapján a fehérjére jellemző, 410 nm-nél jelentkező emisszió már a NaOH hozzáadását követő 10–15 percben kialakul, majd keveset

csökken 60 percig, és ezután nem változik. A NCs csúcsa már a korai szakaszban elkezd kialakulni, lassabban növekszik 60-90 percig, utána monoton növekszik az intenzitás, majd telítésbe megy át. Feltételezhető, hogy a NaOH hozzáadását követően kialakul egy kéken emittáló intermedier (vagy olyan szerkezet, ami a fehérje emisszióját erősíti), és ennek megszűnése után tudnak hatékonyan kialakulni a NCs. 16 óra eltelte után a minta fluoreszcenciája már csökkenést mutat, így ezt választottuk ki ideális értéknek. Fontos megemlíteni, hogy gyakorlati szempontból nem tapasztaltunk lényegi eltérést a 16 és 24 órás minták között későbbi méréseinknél, ezért a szintézisidő változtatása a 12–24 óra tartományon belül inkább önkényes döntés kérdése. A 24 órás minta esetén az is okozhatta az alacsonyabb intenzitást, hogy a felhasznált minta folyamatosan fénynek és levegőnek volt kitéve, ami nyilvánvalóan rontotta a termék optikai tulajdonságait, hiszen a mérés végén alacsonyabb emisszió volt elérhető, mint a zavartalan mintáknál.

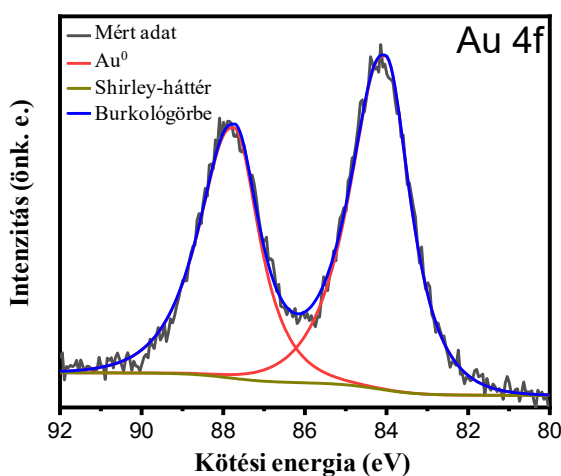
5.1.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése

Az egyfémes BSA-Au NCs jól ismertek a szakirodalomban, előállítási folyamatuk optimalizálása számos munka témája volt ^{21,30,105,116,117}, így ezen szintézis vizsgálatára részletesen nem térünk ki. Célunk sokkal inkább a reprodukív módon előállított BSA-Au NCs fluoreszcens jelzőanyagként való felhasználása volt, de alkalmazásuk előtt a termék jellemzését elvégeztük, és az eredményeket összevetettük a kétfémes származék főbb jellemzőivel (Részletesebb jellemzés korábbi, a kutatócsoport által közölt cikkekben megtalálható ^{128,130}; a bioaktivitást célzó méréseket a további NCs-vel együtt az 5.5.4. Biológiai aktivitást mérő vizsgálatok fejezetben foglaltuk össze). A BSA-Au NCs erős vörös emisszióval rendelkeznek 650 nm körüli emissziós maximummal (350 nm gerjesztési hullámhossz mellett), ehhez 1,2 μ s átlagos élettartam rendelhető, emellett a $QY = 5,4\%$ ¹²⁸. A viszonylag magas élettartam nagy valószínűséggel LMCT vagy LMCCT típusú átmenethez tartozik, ahol a gerjesztett állapot egy fémközpontú triplett állapot lehet, tehát a folyamat nem fluoreszcencia, hanem foszforeszcencia. Összevetve az élettartamokat más forrásokkal ^{4,56,86} látható, hogy az átmenet a tiol-Au(I) átmenetekhez rendelhető. A mintákról készült UV-Vis spektrumokon nem jelenik meg a nemesfém NPs-re jellemző plazmon sáv, tehát a mintát kizárólag kisméretű NCs alkották. További érdekesség, hogy a NCs-nek nincs jellemző elnyelési sávjuk abban a tartományban, ahol a gerjesztési maximum található. Az egyedül kivehető csúcsok mind a fehérje aminosavjaihoz rendelhetők, a NCs inkább csak egy fényszóráshoz hasonló, exponenciálisan lecsengő görbét adnak. A tisztítási folyamat

után a minta Au-tartalmának 20 %-át elveszíti, ahogyan azt ICP-MS mérésekkel megállapítottuk. A tisztításként alkalmazott dialízis hatással van a minták emissziójára is, azt jelentősen képes csökkenteni. Ennek hátterében két folyamat is állhat, az egyik a fémtartalom lecsökkenése, a másik pedig a pH, és vele együtt az ionerősség erőteljes csökkenése. Az Au NCs felépítését XPS mérésekkel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a fémmagok döntően Au⁰-ból épülnek fel, mivel a 4f_{7/2} sávot 84,2–84,5 eV között észleltük. Mivel az Au(0)-hoz rendelhető érték 84 eV körüli ²¹, és ez Au(I)-re ennél magasabb (85 eV), így feltehetően Au(0) és Au(I) vegyesen alkotják a NCs-et. Összevetve a fluorimetria eredményeivel és a szakirodalmi értekezésekkel azt a feltételezést tehetjük a NCs szerkezetére vonatkozóan, hogy egy Au(0) atomokból felépülő magot egy Au(I)-tiolát burok vesz körül, aminek kialakulását az Au(0)-Au(I) közötti magas affinitás segíti elő ⁸⁶. A NCs atomszámára lehetne becslést tenni a **11. egyenlet** („Jellium-modell”) szerint, ahogy azt más szerzők tették ²¹, de mivel az átmenet nem közvetlenül a fémmaghoz rendelhető, így ez téves következtetés lenne. A HRTEM mérések bizonyították a kompakt fémmagok jelenlétét, méretük $d = 1,4$ nm, ami igen hasonló más BSA-Au NCs-hez (1,4 nm ⁵⁷, 1,8 nm ³⁰). A BSA-nal stabilizált minták hidrodinamikai átmérőjét (d_H) DLS mérésekkel is ellenőriztük, itt jóval nagyobb méretet kaptunk ($4,7 \pm 1,8$ nm). A DLS mérésekkel meghatározott méret alapvetően kisebb, mint a szabad BSA-nál várható (7,4 nm ⁵⁷), de ez a különbség betudható a változó pH és ionerősség hatásának. Az értékek alapján is jól látszik, hogy a teljes rendszer mérete nagyobb az egyedi Au-magoknál, köszönhetően a nagy fehérjeburoknak. A NCs kolloidstabilitását PBS-pufferben is vizsgáltuk 0,1 M ionerősség biztosítása mellett, pH = 7,4 értéken. A meghatározott ζ -potenciál érték $-26,4 \pm 1,3$ mV, és azt mutatja, hogy fiziológias körülmények mellett a NCs jó kinetikai stabilitással bírnak. Az optikai tulajdonságok pH-függését is vizsgáltuk, tapasztalataink alapján a NCs széles tartományon megőrzi emissziós spektrumuk alakját és intenzitását. Nagyon alacsony pH (nagy koncentrációjú erős sav) hatására azonban elveszítik kinetikai stabilitásukat és a fluoreszcencia jelentős részét is, ezért ilyen körülmények mellett nem alkalmazhatók. FT-IR és CD mérésekkel igazoltuk a NC-képződés fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását. A fehérje láncok a NC-magok jelenlétében megnyúlnak és kitekerednek, ennek hatására lecsökken a rendezett szerkezeti elemek hozzájárulása, illetve megnő a rendezetlen szerkezet aránya.

A kétfémes NCs esetén első lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy mekkora az egyes NCs aktuális fémtartalma. Az ICP-MS mérések azt mutatták, hogy a NCs tisztítását követően a mintákban az eredeti fémtartalomnak csak 68 %-a (Au) és 44 %-a (Ag) marad meg. Az

Ag-tartalom esetén az érték későbbi méréseknél kapott eredmények miatt nem megbízható, ez leginkább mintaelőkészítési hibáknak tudható be. Fontos megjegyezni, hogy a tisztítás (dialízis) során a minta és a dialízisközegek közötti nagy koncentrációkülönbség (pH = 12 miatt 0,01 M OH⁻-ion, Na⁺ és ellenionok) víz beáramlását eredményezte a mintába, ezzel ismeretlen mértékben megnövelve annak térfogatát, ezért a mérési eredményeknél valójában biztosan kisebb volt a fémvesztés. A BSA kiáramlása annak nagy molekulatömege miatt (~ 66 kDa, ^{21,68}) nem volt lehetséges. A fémionok szintézis során bekövetkezett redukcióját XPS mérésekkel igyekeztünk bizonyítani. A mérések során vizsgáltuk az aranyhoz tartozó kötési energiákat: az Au 4f csúcsokat a **21. ábrán** mutatjuk be, de ezüst esetén annak túl alacsony koncentrációja miatt a jel nem érte el a műszer kimutatási határát.



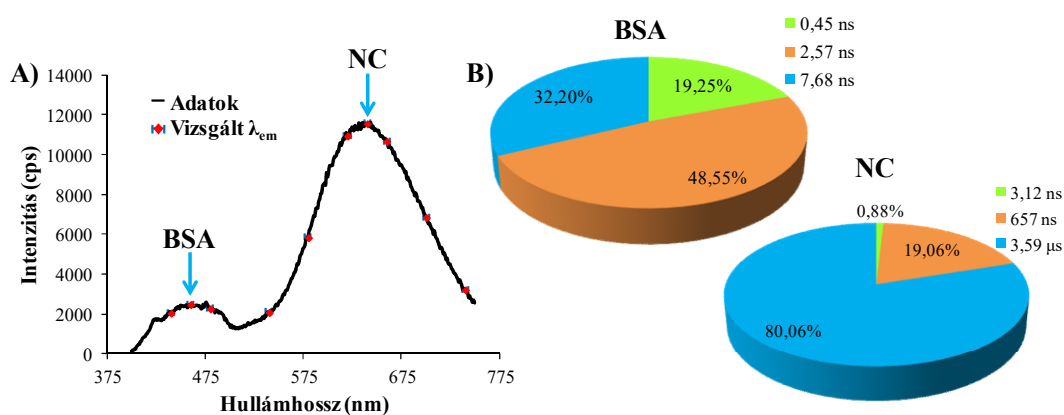
21. ábra: A BSA-Au/Ag NCs röntgen fotoelektron spektrumának részlete ¹³¹

A mérési eredmények szerint az Au nulla oxidációs állapotban található a mintákban, az Au 4f_{7/2} (második csúcs) és 4f_{5/2} (első csúcs) értékeket rendre a 83,7–84,5 eV (pontosan 84,03 eV) és 87,4–88,2 eV közötti tartományon mértük. Az Au esetén elmondhatjuk, hogy a kétfémes NCs-ben még nagyobb arányban van jelen a nulla oxidációs állapot, mint az egyfémes BSA-Au NCs rendszerben.

Mint ahogy az optimalizálás során láthattuk, a NCs narancsvörös emisszióval rendelkeznek, pontos értéke változik valamennyit a tisztítás hatására. A BSA-Au/Ag NCs-nél a $\lambda_{\text{max}} = 620$ nm (365 nm gerjesztési hullámhossz alkalmazásakor). A BSA-Au NCs-hez képest az emissziós maximum ~40 nm-rel tolódik el ($\lambda_{\text{max}} \sim 660$ nm-ről), és a fémtartalomra normalizált intenzitás több mint ötszörösére emelkedett. A QY értékét mérve azt láthattuk, hogy a kis Ag-tartalom hatására az jelentősen, akár 68 %-kal megnövelhető. Az egyfémes NCs-nél $1,47 \pm 0,41$ % volt jellemző, míg a kétfémes NCs-nél

ez $2,47 \pm 0,61$ %-ra emelkedett. A BSA-Au NCs-nél jelentősen alacsonyabb QY-t mértünk ki ¹³⁰ az azonos szintézis ellenére, mint a korábbi kutatócsoporti cikkben (QY = 5,4 %) ¹²⁸. Ennek magyarázata nagy valószínűséggel a mérési körülményekben, az adatközlés és a számolási módszer eltérésében lehet. A mérések eltérő műszereken készültek, illetve a referencia is eltérő (krezil-ibolya ¹²⁸ vagy a Jasco referencia fényforrása ¹³⁰). Mivel a NCs nagyon alacsony QY-kal rendelkeznek, illetve az integráló gömbbel mért emissziós intenzitás nagyon alacsony, ezért a mérések jelentős hibával lehetnek terhelve. A mérést nehezíti még, hogy a helyes kiértékeléshez szükséges a teljes emissziós spektrum, viszont a gerjesztéshez használt lámpa jele annyira alacsony 700–750 nm felett, hogy sok esetben indirekt gerjesztési elrendezésben nagyobb jelet kaptunk, mint amikor a mintát közvetlenül gerjesztettük, és emiatt a QY akár negatív értéket is felvett, és nem kaptunk párhuzamos eredményeket sem. Az indirekt gerjesztési helyzetben mért spektrum használata nélkül a QY értéke magasabb, és az adatok szórása az egyes mérések között sokkal alacsonyabb lett, tehát az így nyert eredmények megbízhatóbbak.

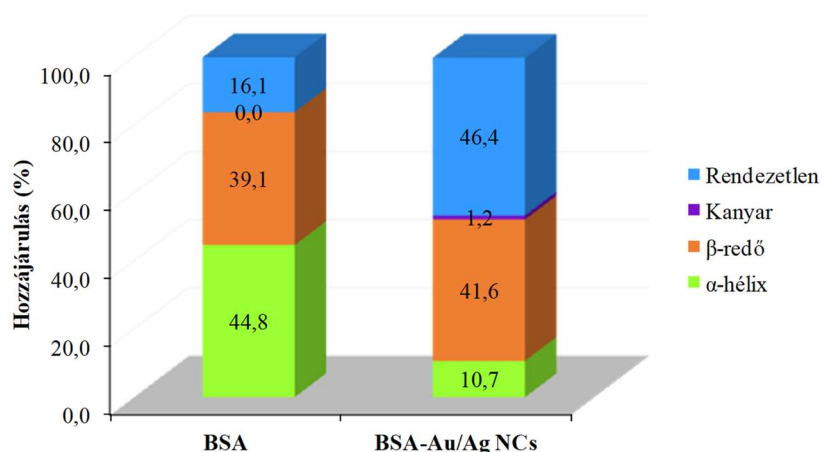
A NCs fluoreszcencia lecsengési görbéi az egyfémes rendszerrel mutatnak hasonlóságot; a vizsgált hullámhosszon az emissziót három tag szolgáltatja. Ezek jól hozzárendelhetők az egyes töltésátmeneti folyamatokhoz. A legnagyobb hozzájárulást a μ s-os komponens (1,6 μ s) szolgáltatja, 96,64 % mértékben, a közbenső élettartam 63,8 ns, 2,40 % hozzájárulással, míg a legrövidebb élettartamú komponens 1,6 ns (0,96 %) hozzájárulása elenyésző. A mért adatok összehasonlítása irodalmi adatokkal nem volt kivitelezhető, mert kétfémes, BSA-Au/Ag NCs-vel foglalkozó írásokban egy esetet kivéve ¹⁰⁵ nem történt meg ennek mérése, így ez munkánk újszerűségét is emeli. Ebben a munkában a mérési görbe kinézete alapján egyértelmű, hogy a mérés nem jól kivitelezett, mivel alapvonal-emelkedés tapasztalható az Au és Au/Ag NCs-nél, ami egy, a mérési tartományon kívül eső élettartamú komponens jelenlétét jelzi. A meghatározott élettartamok Au NCs-re: 0,14; 1,30 és 32,9 ns, míg kétfémes NCs-re: 0,12; 1,20 és 11,8 ns voltak $\lambda_{\text{gerj}} = 409$ és $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm mellett, azonban értelmezésüket nem végezték el a cikkben. A NCs emissziós görbéjének több pontján is elvégeztük az élettartamméréseket (**22. A) ábra**), és a NCs-re jellemző emissziós sávnál három komponensre bontható a lecsengési görbe (**22. B) ábra**), ezek 3,6 μ s, 660 ns és 3–5 ns körüli értékek.



22. ábra: A) A BSA-Au/Ag NCs élettartamméréséhez felhasznált adatpontok (pirossal) B) és a két kijelölt hullámhosszon (460 és 640 nm, kék nyíl) elvégzett elemzés eredményei

Az első tag mértéke alapján egy foszforeszcens átmenet lehet, nagy valószínűséggel a $S \rightarrow Au$ LMCT vagy LMMCT típusú töltésátmenet. A második átmenet beazonosítása nehézkes, de a harmadik átmenet nagy valószínűséggel a fehérjéhez tartozik. Ez abból is valószínűsíthető, hogy hozzájárulása folyamatosan emelkedik, ha alacsonyabb hullámhosszok mellett elemezzük a mérési adatokat. A három átmenet hozzájárulása 640 nm-en (a TCSPC során mért emissziós maximum) a következők: $80,06 \pm 0,28$, $19,06 \pm 0,37$ és $0,88 \pm 0,35$ %. Az értékek alapján egyértelmű az LMCT/LMMCT meghatározó szerepe a NCs kiemelkedően magas emissziós intenzitásában. A fehérjéhez tartozó csúcsot ($\lambda_{em} = 460$ nm) három vagy négy komponensre is fel lehet bontani ($\chi^2 = 1,5378$ és $1,0421$). A három komponens a következők: $7,68 \pm 0,14$ ns, $2,57 \pm 0,13$ ns és $0,45 \pm 0,019$ ns (**22. B) ábra**). Az utolsó két tag egyértelműen párosítható a Trp saját emissziójához (két tag 0,43 és 3,06 ns-nál), ezek függetlenek az aminosav környezetétől, míg a harmadik egy hidrofí/hidrofób környezettől függő tag lehet ¹³⁸. A BSA-ban a Trp élettartamai a következők: 0,265, 3,055 és 6,58 ns, ezekkel az értékekkel jól megegyeznek a mi általunk mért adatok. Érdekes módon a ¹⁰⁵ cikkben mért élettartamok is inkább a Trp értékeire hasonlítanak, mintsen a fémes NCs-ére. Az illesztésünk sokkal nagyobb pontosságú lett négy paraméterrel, ezek rendre 9,39, 3,59, 1,04 és 0,18 ns voltak, de hozzárendelésük a Trp értékeihez nem pontos, így elvethetjük ezt a lehetőséget.

CD mérésekkel igazoltuk, hogy a NC-képződés, azaz a fémmagok fehérjében történő kialakulása megnyújtja a láncokat. A BSA esetén az α -hélix tartalom drasztikusan lecsökken 44,8 %-ról 10,7 %-ra, míg a rendezetlen szerkezet 16,1-ről 46,5 %-ra emelkedik (**23. ábra**). FT-IR méréseink is hasonló eredményt szolgáltatnak, erősítve ezeket a feltételezéseket.

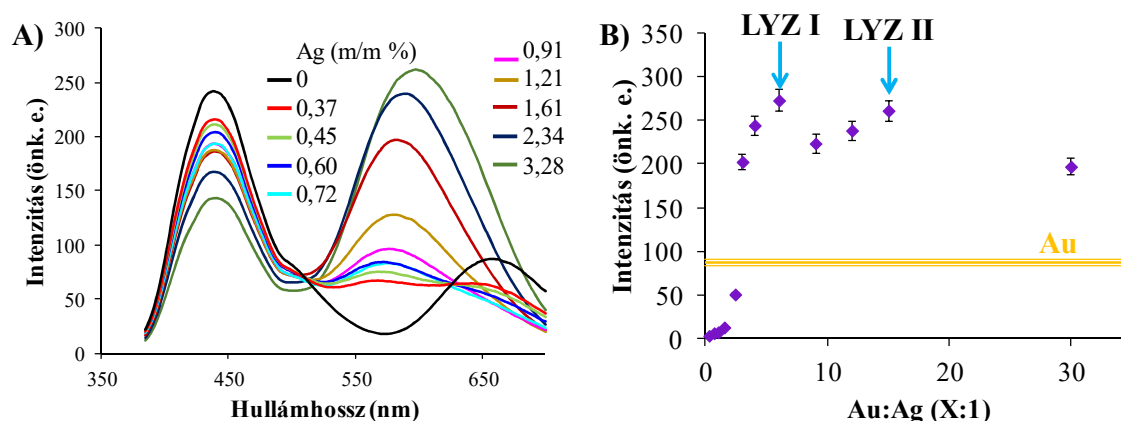


23. ábra: A BSA másodlagos szerkezeti elemeinek megoszlása a szabad fehérje és a BSA-Au/Ag NCs esetén a CD eredmények Reed-modell szerinti kiértékelése alapján ¹³¹

5.2. LYZ-mal stabilizált egy- és kétfémes NCs

5.2.1. Az előállítási protokollok kidolgozása

Kétfémes Au/Ag NCs-et is állítottak már elő LYZ segítségével ⁷³, azonban az eredmények inkább az Au NCs-re hasonlítottak, ezért a BSA-nál bevált módon ennél a fehérjénél is elvégeztük az optimalizálást. A LYZ-mal stabilizált NCs esetén szintén a *fémösszetétel variálásával* kezdtük az optimalizálást. Ezeknél a mintáknál magasabb fehérjemennyiséget (20 mg) használtunk, követve a ⁷² közlemény ajánlásait. A reakció kivitelezésekor itt is jelentős színváltozások voltak tapasztalhatók. Az $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionok hozzáadása erős színváltozást okozott, a BSA-hoz hasonlóan itt is narancssárga, majd rózsaszín szín jelezte az adduktumok létrejöttét. A minták kissé visszasárgultak hosszabb idő után, még az NaOH hozzáadása előtt. Magasabb Ag-tartalom esetén nem látható a fémhez kötődő színváltozás, ellenben a minták opálosodnak, ami itt is Ag-tartalmú csapadékhoz (nagy valószínűséggel AgCl) köthető. A NaOH hozzáadására a magas Au-tartalmú minták besárgulnak, emellett erősen csapadékosak lesznek, ami a fehérje, de inkább az adduktum destabilizálódását jelzi, mivel nagy Ag-tartalomnál ilyen nem jelentkezik. Ha magas az Ag mennyisége, akkor a kezdetben enyhén opálos minták a pH-változás hatására nem opálosodnak, hanem inkább csak feltisztulnak. Ez az Ag^+ és a LYZ közötti gyenge kölcsönhatást jelzi, itt nagy eséllyel a NaOH hozzáadása előtt nem alakul ki adduktum. A BSA-Au/Ag NCs-hez képest a LYZ eltérően viselkedett az Ag jelenlétében, nagyon kevés Ag rendszerbe vitele is drámai hatással volt a minták optikai sajátságaira (**24. A) ábra**).



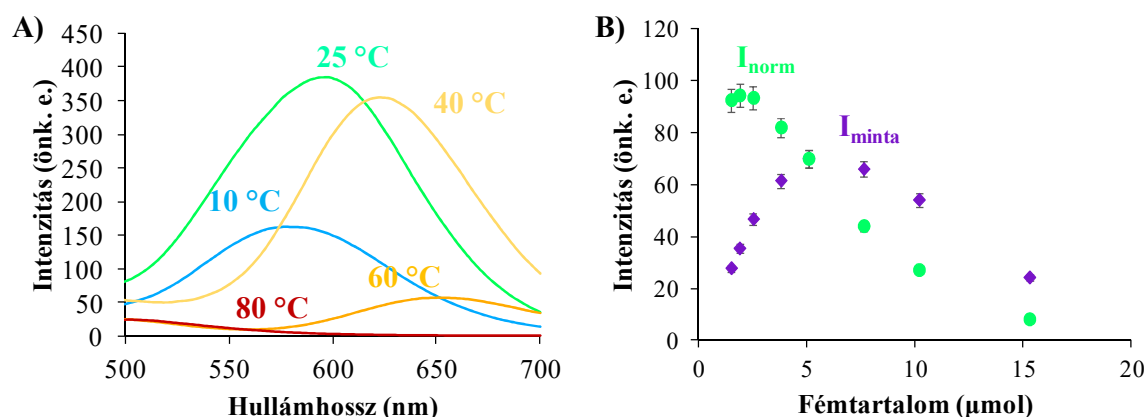
24. ábra: A) LYZ-Au/Ag NCs emissziós spektrumi eltérő Au/Ag tömegarányánál A) 0–3,3 m/m% Ag-tartalom mellett B) a teljes vizsgált tartományban, $n_{\text{fém}} = 5,10 \mu\text{mol}$, $c_{\text{LYZ}} = 15 \text{ mg oldva } \{5,88 \text{ ml mintában}\}$, $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 12$, $\lambda_{\text{gerj}} = 370 \text{ nm}$. A sárga Au jelzés a BSA-Au NCs ($m_{\text{Au}}:m_{\text{Ag}} = 1:0$) emissziós maximumán mért intenzitás értéket jelöli azonos műszeren mérve¹³¹

Nagyon alacsony Ag-tartalom mellett tulajdonképpen két párhuzamos csúcsot láthatunk, amiket $\lambda = 660$ és $570\text{--}575 \text{ nm}$ maximumoknál detektáltunk. Nagy valószínűséggel itt kétféle NC jön létre, a tiszta Au NCs és a kétfémes Au/Ag NCs. Ahogyan a **24. A) ábra** is szemlélteti, amikor az Ag mennyisége $1 \text{ m/m}\%$ fölé emelkedik, akkor a rendszerből teljesen eltűnnek a tiszta Au NCs kialakulására utaló emissziós maximumok, és a kétfémes származékhoz rendelhető emisszió kezd meghatározó lenni. További érdekesség, hogy csúcscsökkentés elvégzése után az $1 \text{ m/m}\%$ -nál több ezüstöt tartalmazó mintáknál szintén két csúcsra osztható fel a NCs emissziója, de a második nem 660 nm (Au NCs), hanem 610 nm körüli. Ez feltételezhetően egy másik összetételű Au/Ag NC-hez tartozó emisszió, amiben nagyobb az Ag-tartalom. A vizsgált tartományon ($1,5\text{--}10 \text{ m/m}\%$ Ag, **24. B) ábra**) az Ag megjelenésére az emissziós maximum 660 nm -ről tehát először $570\text{--}580 \text{ nm}$ -re tolódott el, majd ezután további Ag hatására $610\text{--}620 \text{ nm}$ -re. Két összetétel esetén tudtunk lokális maximumot azonosítani, egyet 598 nm -en, ez lett a LYZ-II-Au/Ag NCs ($\sim 3 \text{ m/m}\%$ Ag, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 16:1$), emellett 629 nm -nél (LYZ-I-Au/Ag NCs, $\sim 8 \text{ m/m}\%$ Ag, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 6:1$). A további optimalizálási lépéseket ezután mindkét összetételben végrehajtottuk. A $10 \text{ m/m}\%$ feletti ezüstöt tartalmazó mintáknál egyértelmű intenzitáscsökkenés volt tapasztalható, emellett a minta színe is egyre mélyebb lett, jelezve a BSA-hoz hasonlóan az Ag NPs megjelenését. A tisztán Ag-öt tartalmazó rendszerben is kimutatható minimális emisszió, ennek maximuma a mérési tartományon kívül esett ($> 700 \text{ nm}$). További érdekesség a

BSA-hoz képest, hogy ebben a rendszerben a LYZ-hoz tartozó emissziós csúcs (450 nm) intenzitása is változik a fém összetétellel. Jól látható a **24. A) ábrán**, hogy tiszta arany mellett a legmagasabb ez az érték, és folyamatosan csökken, egészen a tiszta ezüstig. A fém nélkül kezelt LYZ-hoz képest alacsonyabb a 440 nm-nél detektálható csúcs intenzitása 2:3 Au-Ag molarány alatt (nincs ábrázolva).

A *fehérje mennyiségének* megváltoztatása hasonló eredményt hozott a két kiválasztott összetételnél. Alacsony LYZ-koncentrációk mellett plazmonikus NPs képződnek, színük valamelyest eltér a BSA-nál tapasztalttól, itt jóval mélyebb színek észlelhetőek, amik eltérnek a két összetételnél is. A LYZ-I rendszernél az alacsony fehérjetartalmú minták (1-2 mg az 5,88 ml kezdeti fehérjeoldatban) esetén már 30 perc után látható a plazmonikus NPs megjelenése, a végtermék mély bordó színű. Ezeknél a mintáknál túl alacsony a LYZ mennyisége, ezért nem minden fémion képes adduktumot képezni a fehérjével, ami a színváltozásból is látható volt, itt barna színig jutnak a minták, ami nagyobb részecskék jelenlétére utalhat. Ahol a színváltást (sárga-narancs) opálosodás követte, ott kialakultak lumineszcens NCs. A LYZ-felesleg 9-szeresre emelése (m_{Au} -hoz viszonyítva) már észlelhető emissziós sáv kialakulását okozza. Ennél nagyobb LYZ-tartalom folyamatosan növeli a fluoreszcencia nagyságát, egészen 52,5:1,0:0,09 LYZ-Au-Ag tömegarányig (45 mg LYZ 5,88 ml oldatban). Nagyobb fehérjetartalomnál már csökken az intenzitás, és a legnagyobb mennyiségnél (150 mg) a fehérje aggregál, illetve makroszkopikus gél képez. A LYZ-II rendszer hasonlóan viselkedik, itt a kis LYZ-mennyiségeknél kialakuló NPs eleinte kék-fekete színűek, majd mély lilák, ami nagyobb méretű NPs kialakulására utal. Több fehérje mellett már NCs jönnek létre, amit a minták narancsos színe jelzett. Fluorimetriás mérések alapján a 63,5:1,0:0,03 (60 mg LYZ) összetételnél érték el a maximális intenzitást, efelett csökkenés mérhető, illetve 120 mg fehérjénél lágy, 150 mg-nál pedig tömörebb gél jön létre, ami nem képes benntartani az összes folyadékot, ezek lemerésére nem is került sor.

A *hőmérséklet* változtatása közel azonos eredménnyel zárult, mint a BSA esetén (**25. A) ábra**). Az érték 40 °C-ról 25 °C-ra csökkentése világosabb színt, magasabb emissziós intenzitást és alacsonyabb emissziós maximumot eredményezett mindkét összetétel esetén. A λ_{max} értéke egészen 597 és 567 nm-re módosult a LYZ-I- és LYZ-II-Au/Ag NCs-nél, ezek narancssárga és sárga emissziót jelentenek a megfelelő NCs-nél, ami az UV-megvilágítás mellett készült felvételeken is jól kivehető volt.

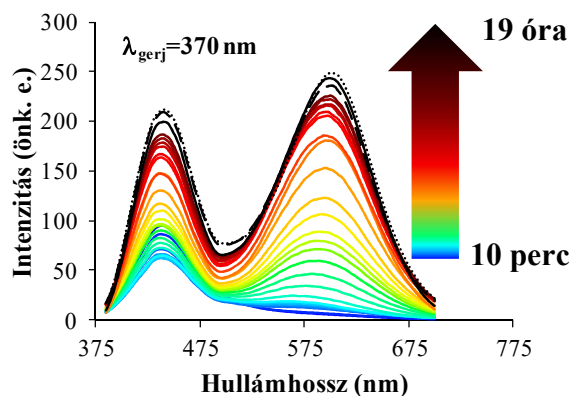


25. ábra: A) A hőmérséklet hatása a LYZ-I-Au/Ag NCs képződésére ($n_{\text{fémion}} = 5,10 \mu\text{mol}$, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 5,8:1$, $c_{\text{LYZ}} = 45 \text{ mg oldva } \{5,88 \text{ ml mintában}\}$, $\text{pH} = 12$). B) A fémtartalom hatása a LYZ-II-Au/Ag NCs intenzitására ($n_{\text{fémion}} = 1,53\text{--}15,30 \mu\text{mol}$, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 15,9:1$, $c_{\text{LYZ}} = 60 \text{ mg oldva } \{5,88 \text{ ml mintában}\}$, $\text{pH} = 12$), I_{minta} : a minta emissziós intenzitása, I_{norm} : a fémtartalomra normált intenzitás, $\lambda_{\text{gerj}} = 370 \text{ nm}$ ¹³¹

A fémtartalom változtatását az eredeti koncentrációhoz képest 0,3–3,0-szeres tartományon (1,53–15,30 μmol) változtattuk (**25. B) ábra**; a BSA-nál alkalmazott 28,69 μmol értéket nem használtuk, mivel hasonlóan alacsony emissziós intenzitás volt várható LYZ-nál is). Mindkét esetben az alacsonyabb értékek nyújtottak nagyobb emissziót (fémtartalomra viszonyítva), rendre 2,55 (LYZ-I) és 1,91 μmol (LYZ-II) esetén, ezeken a koncentrációkon a BSA-nál tapasztaltakkal egyezően itt is igen közeliek a beütésszámok.

A NaOH mennyiségének a hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a NaOH esetén nem volt látható nagy hatás, ettől függetlenül a legnagyobb emissziót szolgáltató mennyiségeket választottuk, ami 470 μl volt a LYZ-I és 370 μl a LYZ-II rendszereknél. A LYZ oldási idejét a BSA-hoz hasonlóan a kezdeti 1 órától 15 percre tudtuk csökkenteni.

A szintézisidő valamennyire eltérő hatással volt a BSA-nál tapasztaltakhoz viszonyítva, ahogy az a **26. ábrán** is látható. Itt 24 óra eltelte után az emisszió még tovább emelkedett, még 72 óránál sem mutatott csökkenést. Az érték viszont nem különbözött túlzottan az egy napos időnél mérttől, így a továbbiakban gyakorlati szempontokat is figyelembe véve mindkét rendszernél ezt az értéket tekintettük megfelelőnek.



26. ábra: A szintézisidő hatása 0–48 óra tartományban a LYZ-I-Au/Ag NCs emissziós színeképre, $n_{\text{fémion}} = 2,55 \mu\text{mol}$, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 5,8:1$, $c_{\text{LYZ}} = 45 \text{ mg oldva } \{5,98 \text{ ml mintában}\}$, $\text{pH} = 12$, $t = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{gerj}} = 370 \text{ nm}$ (szaggatott vonal: 24 óra, pontozott vonal: 48 óra) ¹³¹

5.2.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése

A LYZ-Au NCs-re is találhatunk közleményeket a szakirodalomban ^{20,72,128}, bár ezzel a fehérjével kevesebbet foglalkoztak, mint a BSA-nal. Célunk esetükben is a fluoreszcens jelzőanyagként való használat volt, a NCs jellemzése a kutatócsoport cikkeiben fellelhető ^{128,130}. Röviden összefoglalva, az általunk előállított LYZ-Au NCs erős vörös emisszióval rendelkeznek, $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{gerj}} = 350 \text{ nm}$). Ehhez az emisszióhoz 1,9 μs -os átlagos élettartam tartozik, továbbá a NCs QY értéke $\sim 4\%$. A nagy élettartam hasonló LMCT vagy LMCCT típusú átmenethez tartozhat, mint a BSA-Au NCs-é, és a jelenség szintén foszforeszcencia lehet. Habár az élettartamokat nem tudtuk más munkákkal összehasonlítani, a QY a ⁷³ szerint 4,5 % volt LYZ-Au/Ag NCs-re (rodamin-B referenciához viszonyítva), ami hasonlít az általunk készített mintákra. Az átmenet típusa a BSA-nál nyert eredményekből kiindulva itt is a $\text{S} \rightarrow \text{Au(I)}$ lehet. Bár a mintákról nem készült UV-Vis spektrum, színük alapján kijelenthető, hogy nem tartalmaztak plazmonikus Au NPs-et, Ag NPs jelenléte pedig a nagyon alacsony Ag-tartalom miatt kizárható. A tisztítás céljából elvégzett dialízis következtében a minta Au-tartalmának közel 20 %-át elveszíti az ICP-MS mérések alapján, és erre utal az emisszió csökkenése is. A LYZ-Au NCs-et nem vizsgáltuk XPS mérésekkel, de nagy valószínűséggel itt is Au(0) és Au(I) alkotják a NCs-et. Az emissziós spektrumok és a BSA-Au NCs eredményeit összevetve ezeknél a NCs-nél is valószínű az Au(0) atomokból felépülő mag, illetve egy azt körülvevő Au(I)-S réteg, ami a foszforeszcens átmenetet szolgáltatja. A HRTEM felvételek a LYZ esetén is igazolták a fémmagok kialakulását, és méretüket 1,4 nm-nek állapítottuk meg. A NCs-re a d_{H} DLS

mérések alapján valamivel nagyobb a BSA-Au NCs-nél ($5,0 \pm 1,4$ nm a $4,7 \pm 1,8$ nm-hez képest), és a szabad LYZ-nál is ($3,9$ nm ¹⁰⁶), ami jól mutatja a nagyobb NC-magok megjelenésének feszítő hatását a makromolekula térszerkezetére. A NCs kinetikai stabilitását $0,1$ M ionerősségű PBS-pufferben is vizsgáltuk $\text{pH} = 7,4$ mellett. A meghatározott érték $\zeta = -15,4 \pm 2,7$ mV volt. Az alacsonyabb érték azzal magyarázható, hogy a LYZ i.e.p-ja sokkal magasabb, mint a BSA-é, ettől függetlenül a NCs kinetikai stabilitása fiziológias körülmények között jó. Az emissziós spektrumok változását is megfigyeltük a pH függvényében, és a NCs a fehérjék igen eltérő tulajdonságai ellenére valamelyest meglepő módon a BSA-Au NCs-ekkel hasonlóan viselkedtek. A FT-IR és CD-mérések a BSA-hoz hasonló eredményeket szolgáltatottak, és a szerkezet rendezettségének csökkenését mutatták.

A *LYZ-Au/Ag NCs-nél* először az egyes NCs valós fémtartalmát határoztuk meg, mivel a BSA-Au/Ag NCs-nél is tudtuk, hogy a tisztítás lecsökkenti a fém mennyiségét. Az ICP-MS mérések eredményei alapján az eredeti fémtartalomnak csak 65 (Au) és 80% -a (Ag) marad meg a tisztítás végére, ennek hatására a NCs összetétele a kezdeti $92:8$ (LYZ-I) és $97:3$ Au-Ag tömegarányokról (LYZ-II) $90:10$ és $96:4$ értékekre változott. Mivel a LYZ molekulatömege $14,3$ kDa, így a dialízis során lehetséges volt az anyag membránon keresztül (vágási értéke 14 kDa) történő távozása. Ennek nem tapasztaltuk jelét a tisztítás során, illetve a membránon belül még nőtt is a minta térfogata, köszönhetően a membrán két oldalán lévő óriási koncentrációkülönbségnek.

A fémionok redukcióját XPS adatok értelmezésével próbáltuk igazolni. Ezüst esetén ezeknél a NCs-nél is túl alacsony volt a jel, így itt is csak az aranyra nyertünk információkat. A fém a mérések alapján leginkább Au(0) formában volt a mintákban, az Au $4f_{7/2}$ és $4f_{5/2}$ értékeket rendre $84,1$ – $84,2$ eV és $87,8$ – $87,9$ eV közötti tartományon mértük. A BSA-Au/Ag NCs-hez viszonyítva itt is feltételezhető az Au(I) forma jelenléte, de mennyisége biztosan alacsonyabb.

A termék NCs narancs és sárga emissziókkal rendelkeztek, a pontos maximum helye a LYZ-I rendszernél valamivel magasabb, 600 – 610 nm ($\lambda_{\text{gerj}} = 370$ nm), míg LYZ-II-nél $\lambda_{\text{em}} = 565$ – 575 nm. A kétfémes NCs fémtartalomra vonatkoztatott intenzitása $6,6$ – $7,4$ -szeresére emelkedett a LYZ-Au NCs-hez képest. A korábban is említett csúcspontbontást alkalmazva itt is többféle (legalább 2) összetételű NC alakozhat az egyes termékeket: LYZ-I esetén a magasabb, míg LYZ-II esetén az alacsonyabb Ag-tartalmú NCs vannak többségben. A fluoreszcens jelöléshez használt NCs fontosabb optikai jellemzőit a

2. táblázatban foglaltuk össze. A QY ezeknél a NCs-nél is jelentősen megnőtt az Ag hatására. Míg az egyfémű NCs-re $\sim 1,54 \pm 0,43 \%$ volt jellemző, addig a LYZ-I-Au/Ag NCs-nél ez $7,44 \pm 0,59 \%$ és a LYZ-II rendszernél $4,78 \pm 0,34 \%$ -ra emelkedett (azonos körülmények között meghatározva). A LYZ-Au NCs-re itt is megjelenik az eltérés az egyes publikációk között (lásd ¹²⁸ és ¹³⁰), okai megegyeznek a korábban leírtakkal; az eredményeink a ⁷³ hivatkozásban közölt értékkel (4,5 %) viszont jól összeegyeztethetők.

2. táblázat: A fluoreszcens jelöléshez használt NCs fontosabb optikai jellemzői ^{130,131}

Típus	λ_{gerj} (nm)	λ_{em} (nm)	QY (%)
BSA-Au NCs	350	660	$1,47 \pm 0,41$
LYZ-Au NCs	350	645	$1,54 \pm 0,43$
BSA-Au/Ag NCs	365	622	$2,47 \pm 0,61$
LYZ-I-Au/Ag NCs	370	603	$7,44 \pm 0,59$

A két NC fluoreszcencia élettartamát itt is három tag adja az egyes hullámhosszokon. Hozzárendelésük a fotonkibocsátással járó folyamatokhoz megegyezik a BSA-Au/Ag NCs-nél leírttal, a legnagyobb hozzájárulást ezeknél is a μs -os komponens adta, akár 99,17 és 96,4 % mértékben a LYZ-I- és LYZ-II-rendszereknél ¹³⁰. Ezek értéke ugyanebben a sorrendben $5,83 \pm 1,24 \mu\text{s}$ és $580 \pm 30 \text{ ns}$ volt. A legkisebb komponens $1,5 \pm 0,2 \text{ ns}$ és $1,3 \pm 0,2 \text{ ns}$ volt, 0,16 % és 10,26 % hozzájárulással. A közbenső tag hozzájárulása 0,68 % és 9,6 %, értékük $178,5 \pm 70,7$ és $6,8 \pm 0,6 \text{ ns}$. A nagyobb hozzájárulás az első tagnál nem meglepő, hiszen alacsonyabban van az emissziós maximuma, és nagyobb az átfedés a fehérje csúcsával. Mivel a kétféle rendszer között nagy eltéréseket láttunk, ezért megismételtük ezeket a méréseket. Az új méréseket a BSA-Au/Ag NCs-hez hasonlóan több hullámhosszon is elvégeztük. A LYZ-I-Au/Ag NCs-nél a NC-csúcs három tagra bontható ($\lambda_{\text{em}} = 540\text{--}700 \text{ nm}$ között): a legnagyobb $3,92 \mu\text{s}$ 700 nm-en, és $1,25 \mu\text{s}$ -ra csökken 580 nm-en, míg 540 nm-nél nem észlelhető. A többi tag a **3. táblázatban** látható, a megfelelő hozzájárulásokkal. Jól látható, hogy magas hullámhosszakon pontatlanabb az illesztés, ezért itt feltételezhető egy negyedik tag jelenléte is. A négy paraméteres illesztések eredményei az **F1. táblázatban** láthatók. A legnagyobb tag 11,1–11,6 μs -nak adódott, de figyelembe véve a mérés körülményeit (13,2 μs mérésstartomány) ez az érték nem megbízható, ezért nem sikerült a negyedik, kifejezetten ehhez a rendszerhez tartozó tagot beazonosítanunk. A LYZ-II rendszernél egyszerűbb az adatok értelmezése, mert itt akár két

tag is elegendő pontos eredmények számításához (**F2. táblázat**). A két tag rendre 0,92–1,10 μ s és 5,7–7,0 ns, hozzájárulásuk 95,2–97,1 % és 2,9–4,8 %.

3. táblázat: A LYZ-I-Au/Ag NCs élettartalom értékei öt kiválasztott hullámhosszon

Illesztés három paraméterrel					
λ (nm)	540	580	620	660	700
τ_1 (μ s)	1,71	4,50	9,82	22,25	11,69
τ_2 (μ s)	11,0	154,9	360,3	463,0	561,9
τ_3 (μ s)	0,479	1,246	2,004	2,935	3,928
A_1 (%)	41,36	5,76	0,90	0,16	0,15
A_2 (%)	14,47	7,55	7,73	7,54	6,78
A_3 (%)	44,17	86,69	91,37	92,30	93,07
χ^2	1,097	1,172	1,303	1,683	1,387

A nagyobb tag megjelenik a LYZ-I-Au/Ag NCs-nél is 580 nm-nél, ami tovább igazolja a kevert emisszió, és ezzel a kevert összetétel tényét. Három tag esetén szintén a legnagyobb 1,12–1,76 μ s, a többi tag az **F3. táblázatban** látható. Ezen rendszernél eredményeink (kifejezetten a τ_1) tehát nem pontos adatok, inkább két tag átlagos értékei lehetnek a két összetételből, amik emissziós maximumai 570 és 610 nm. Áttérve a LYZ csúcsára (**F4. táblázat**), LYZ-I esetén háromparaméteres illesztéssel a tagok rendre 7,92 ns, 2,43 ns és 0,40 ns, amik jól megfelelnek a Trp saját élettartamainak és a hidrofób közegben megjelenő harmadik tagnak is ¹³⁸. LYZ-II esetén a három tag kívül esik a fehérjékben várható értékektől ¹³⁸, négy tagnál viszont az első három (0,40 ns, 2,43 ns és 7,92 ns) mind a LYZ-I, mind a Trp értékeivel egyezik. A negyedik tag beazonosítása itt is bizonytalan. A mért adatokat más NCs-ekkel csak Au-Mo rendszernél tudtuk összehasonlítani, itt 1,87 ns átlagos élettartamot adtak meg ¹¹⁸. Ez az élettartam ($\lambda_{em} = 642$ nm $\lambda_{gerj} = 490$ nm mellett) hasonlít az általunk készített NCs kék emissziójához tartozó értékhez (Trp második tag), viszont az eltérő fém (Mo(II)) jelenléte miatt nem lehet további következtetéseket levonni.

CD mérésekkel igazoltunk, hogy a fémmagok megjelenése megnyújtja a fehérje láncait. Az α -hélix tartalom 15,7–15,8 %-ról teljesen eltűnik, míg a β -kanyar elemek 0,3–3,9 %-ról 15,0–17,3 %-ra emelkednek. Ez összhangban van az Au NCs-nél tett megállapításokkal ⁷¹, ahol a 40 % α -hélix tartalom 28 %-ra csökken, és β -kanyar elemek jelennek meg helyette. Emellett 3–4 %-kal megnő a β -redő hozzájárulása, míg a rendezetlen

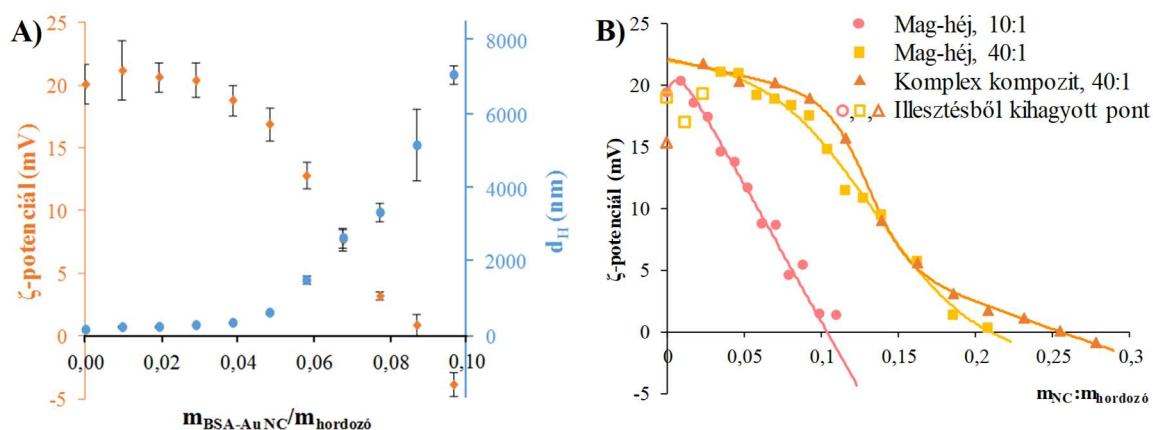
szerkezet csökken 0,5–1,5 %-kal. A Reed-modell adatai abszolútértékben nem feltétlenül helyesek, de a változások irányát megfelelően mutatják.

5.3. Poliszacharid-alapú kolloid részecskék fluoreszcens jelölése

5.3.1. Az egyfémű NCs kölcsönhatása a poliszacharid-alapú kolloid részecskékkel

A jelöléshez készített kétféle típusú hordozó NP-t az ionos gélesedés módszerével állítottuk elő. Részletes jellemzésük egy korábbi publikációban már közlésre került ¹²⁹, sematikus szerkezetük a **16. ábrán** látható. A komplex kompozit rendszernél a TPP és HyA szimultán adagolása tömörebb részecskéket eredményezett, szerkezetükben a poliszacharid molekulák egyenletes eloszlása feltételezhető. A mag-héj szerkezetnél a TPP-vel keresztkötött Chit-magot egy lazább HyA-héj veszi körül. A kb. 6,6-szer nagyobb méretű HyA makromolekulák nem képesek behatolni a tömör, keresztkötött Chit molekulák közé, emiatt az ilyen módon kialakított NPs mérete nagyobb lett a komplex kompozit szerkezetéhez képest. A hordozó részecskék méretét DLS méréssel határoztuk meg vizes közegben, az eredmények alapján elkészítettük a méreteloszlási diagramokat is. Az azonos összetételű (40:1 $m_{\text{Chit}}:m_{\text{HyA}}$ tömegarány) mintáknál a d_H a várakozásoknak megfelelően nagyobb volt a mag-héj ($187,7 \pm 2,5$ nm), mint a komplex kompozit szerkezet esetén ($135,4 \pm 3,6$ nm), ami igazolja a várt szerkezet kialakulását. A felületi töltés és kolloidstabilitás meghatározása érdekében ζ -potenciál méréseket hajtottunk végre. A szintézis körülményei mellett (pH = 4,55–4,60) a ζ -potenciál értéke +11,9–13,3 mV lett, ami azt jelzi, hogy ilyen viszonyok között a NPs nem túl stabilak. A közeg hígítása után ez az érték +15,4–20,6 mV lett, ami minimális stabilitásnövekedést jelent, de hosszabb távon még aggregáció léphet fel ilyen körülmények között. A NPs centrifugálása és újradiszpergálása után a ζ -potenciál értéke Milli-Q vízben +60–70 mV-ra emelkedett, bizonyítva, hogy a minták stabilitása jelentősen függ a mátrixtól, különösen a pH és ionerősség értékétől. Ha a hordozó NPs tokoferol (TCP) hatóanyagot is tartalmaztak, akkor tulajdonságaik kissé megváltoztak. A hatóanyag jelenléte megnövelte a rendszerek ζ -potenciálját +14,2–20,6 mV-ra a puffertelt közegben, ezzel megnövelve a részecskék kinetikai stabilitását. A fenn említett kétféle szerkezetű poliszacharid részecske fluoreszcens jelölését először az egyfémű BSA- és LYZ-Au NCs-ekel hajtottuk végre. Elsőként az utólagos jelölést alkalmaztuk, azaz tulajdonképpen titráltuk a hordozó kolloid részecskéket tartalmazó diszperziót a fluoreszcens NCs-et tartalmazó vizes diszperzióval. A jelöléshez szükséges $m_{\text{hordozó}}:m_{\text{NC}}$ tömegarány megállapítása céljából vizsgáltuk a tömegarány változtatásának hatását a teljes rendszer

stabilitására mind kinetikai, mind optikai értelemben. Célunk a NCs méretre, ζ -potenciáljára, illetve a rendszer fluoreszcenciájára gyakorolt hatásának követése volt. A mérések során azt vettük észre (27. A) és B) ábra), hogy a NCs nagyon kis mennyisége eleinte valamelyest növeli a zéta-potenciál értékét, de utána gyorsan csökkenti azt, köszönhetően annak, hogy a negatív töltésű NCs elektrosztatikus kölcsönhatást alakítottak ki a kolloid részecskékkal, és kompenzálni kezdték annak felületi töltéseit.



27. ábra: A) A d_H és a ζ -potenciál változása utólagos jelöléssel: $m_{Chit}:m_{HyA} = 40:1$ mag-héj részecskék jelölése BSA-Au NCs-ekkel B) a ζ -potenciál változása utólagos jelöléssel LYZ-Au NCs-ekkel, és a semlegesítési pont megállapításához használt illesztett görbék ¹³⁰

Megállapítottuk, hogy a hordozó részecskék felületén jelenlévő poliszacharidok típusa és mennyisége függvényében változik a rendszerek semlegesítési pontja ($\zeta = 0$ mV). Ha azonos hordozó részecskéknél vizsgáljuk a két különböző NC hatását a kinetikai stabilitásra, akkor azt láthatjuk, hogy több LYZ-Au NC szükséges a poliszacharid részecske teljes áttöltéséhez, amit nagy valószínűséggel előbbieket alacsonyabb össztöltése magyaráz. A 10:1 $m_{Chit}:m_{HyA}$ tömegarányú, mag-héj típusú részecskéknél 0,0648 NC-hordozó tömegarányánál történik meg az áttöltés a BSA esetén, míg a LYZ-Au NCs-nél ez az érték 0,1035, ami azt jelenti, hogy a BSA-Au NCs-hez viszonyítva közel 60 %-kal nagyobb mennyiség szükséges ezekből a NCs-ből. Maradva a hasonló szerkezetű, de kevesebb HyA-at tartalmazó hordozóknál (40:1 $m_{Chit}:m_{HyA}$), a semlegesítési pont 0,1222 és 0,2548 aránynál lesz kimérhető. Ha megváltoztatjuk a hordozó szerkezetét (komplex kompozit), akkor több NC kell a semleges töltés eléréséhez (pontosan 0,1064 és 0,2091 NC-hordozó aránynál), tehát a mag-héj típusúhoz képest 13 és 18 %-kal kisebb mennyiségű NC képes megkötődni a hordozó részecskék felületén. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a negatív felületi töltéssel rendelkező Au NCs jobban képesek megkötődni a komplex kompozit típusú gyógyszerhordozó

részecskék felületén. Ez a megfigyelés megerősíti a korábban tett feltevést, miszerint a kialakuló kölcsönhatás elektrosztatikus.

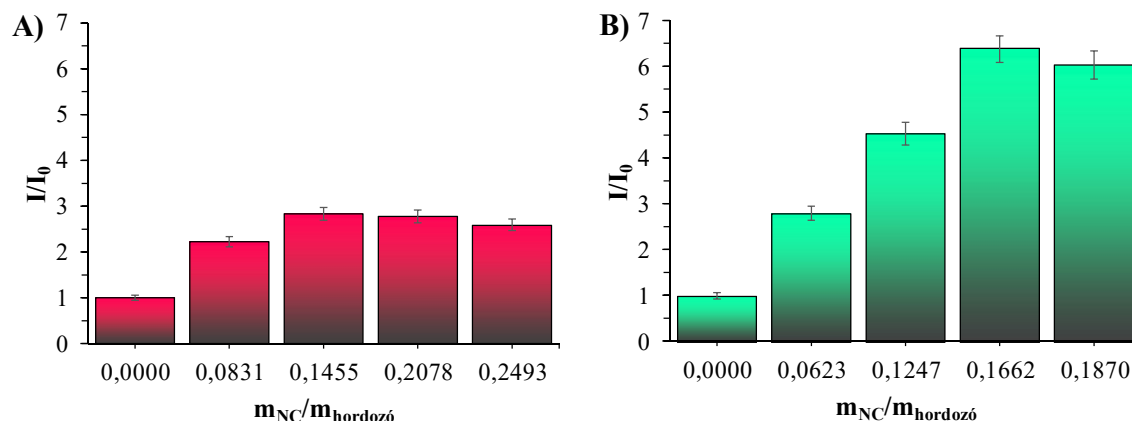
A jelölés méretre gyakorolt hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a NCs adagolásával szisztematikusan nőtt a részecskék mérete a magasabb ζ -potenciálok tartományában, majd a stabilitás erőteljes csökkenésekor gyorsan megugrik a méretük a μ -es tartományba, és 5 mV alatt már részlegesen aggregált is a rendszer. A semlegesítési pont elérése után az összes jelölt hordozó részecske aggregál és kiüledik, további NC-adagolás után pedig már a teljes rendszerre negatív ζ -potenciál értékeket kaptunk, ami szabad NCs jelenlétét feltételezi a közegben. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kolloid részecskék felületének áttöltése nem lehetséges, mert a semlegesítési pont környezetében annyira instabil lesz a rendszer, hogy elkerülhetetlen a hordozók teljes destabilizálódása.

A jelölési reakció kvantitatív vizsgálata után meg akartuk állapítani, hogy a szintézis közbeni vagy szintézis utáni jelölés-e a jobb módszer. Ehhez a kísérletsorozathoz három különböző összetételben készítettük el a szintézis közben jelölt rendszereket. Az előállítás során a NCs-et a HyA-TPP vagy a TPP oldathoz adtuk hozzá, és azt kevertük a puffertelt Chit oldathoz. A mag-héj típusú mintánál a NCs ezáltal a Chit-TPP magba kerültek. Végeredményként azt vártuk, hogy a NCs egyenletesen fognak eloszlan a hordozó részecskékben. Az utólagosan jelölt rendszerek közül is kiválasztottuk a megfelelő összetételű mintákat, itt a NCs felületen való feldúsulását feltételeztük, mivel a NCs méretüknél fogva nem lennének képesek behatolni a NPs belsejébe. Az eredményeink bizonyították, hogy a két módszerrel erősen eltérő termékeket kaptunk, ami szabad szemmel is érzékelhető volt. Az utólag jelölt részecskék turbiditása egyértelműen nagyobb volt, DLS mérésekkel pedig igazoltuk, hogy méretben ezek jelentősen, kb. 10–58 %-kal nagyobbak lettek, mint a jelölni kívánt részecskék (pl. 40:1 $m_{\text{Chit}}:m_{\text{HyA}}$ mag-héj részecskék + BSA-Au NCs: $d_H = 148,4 \pm 2,7$ nm, PI 0,198 jelölés előtt; $160,6 \pm 3,7$ nm, PI 0,199 párhuzamos jelölés, $191,3 \pm 1,1$ nm PI 0,223 utólag jelölés). A részecskeméret emelkedett a párhuzamos jelölés esetén is (kb. 1–15 %-kal) a jelöletlen részecskékhez képest. A mérési eredmények, illetve egyéb szerkezetre gyakorolt hatások alapján a következő észrevételeket tettük: egyrészt a párhuzamos jelölés kisebb részecskéket szolgáltat, és a vörösen emittáló NCs egyenlő mértékben vannak bennük eloszlva. Ez azt jelenti, hogy azonos méretű részecskéket összehasonlítva ilyen módszerrel több NC juttatható a rendszerbe. A párhuzamos jelölés hátránya viszont az, hogy a folyamat jelentősen meg is változtatja a jelölt hordozók szerkezetét, így potenciális hatóanyag-kapszulázási és kioldási sajátosságait is. Ezen

kívül ez a megoldás megnehezíti az utólagos hatóanyag-megkötést is, mivel a részecskék belsejében elhelyezkedő fehérjemolekulák nem érhetők el a hatóanyag-molekulák számára, illetve bizonyos, hogy a másodlagos szerkezetük is jelentősen megváltozik a részecskén belül. Az utólagos jelölésnél nagyobb méretű és kisebb stabilitású részecskéket kapunk, az ilyen rendszerek kevesebb fluoreszcens jelölő NC-t képesek megkötni, ha azokat azonos méretű, szintézis közben jelölt részecskékkal hasonlítjuk össze. Ebben az esetben a NCs a hordozó felületén találhatók, ezért könnyen hozzáférhetők további, fehérjéhez kötődő hatóanyag kapszulázásához, illetve a fehérjeszerkezet is kevésbé változik. Különös észrevétel még, hogy minél több HyA található a hordozó részecskék felületén, annál kevésbé növelik meg a NCs azok méretét: 40:1 $m_{\text{Chit}}:m_{\text{HyA}}$ komplex kompozit részecskékre 32–58 %, mag-héj részecskéknél 29–46 %, míg 10:1 aránynál csak 6–10 %. Ez alapján feltételezhető, hogy a beépülő NCs a külső rétegben, a HyA molekulák között helyezkednek el. A fehérje felületen elhelyezése további előnyökkel is jár, ugyanis lehetővé teszi a megfelelő receptorokon keresztül a jelölt hordozók célzott szövetbe juttatását. E megfontolásokat követve, a jövőbeli felhasználási lehetőségeket is figyelembe véve a további kísérletekben az utólagosan végrehajtott jelölést vizsgáltuk.

A fluoreszcens jelölés hatékonyságát abban az esetben is vizsgáltuk, amikor a hordozó részecskék hatóanyagot is tartalmaznak. A vizsgálat fő szempontja az volt, hogy megállapítsuk azt, hogy a hidrofób hatóanyag (TCP etanolban feloldva) megjelenése a rendszerben hátrányosan befolyásolja-e a NCs megkötődését. Első lépésben ezért megvizsgáltuk a NCs tűrőképességét a megváltozott közegben. A hordozó részecskék sem az etanol, sem a TCP jelenlétében nem mutattak semmilyen változást (pl. fluoreszcencia csökkenését vagy megszűnését, sem színes aggregátumok képződését), egyedül a vízben rosszul oldódó TCP képzett csak részecskéket. Az előzetes stabilitási vizsgálatok lehetővé tették, hogy a TCP-lal töltött poliszacharid részecskéket is megvizsgálhassuk. A mintakészítés ezeknél a méréseknél a korábbiakkal megegyezett, viszont itt a TCP-t a HyA-TPP (komplex kompozit rendszer) vagy a TPP-oldathoz (mag-héj típus) adva juttattuk a részecskékbe, ezután pedig elvégeztük a minták fluoreszcens jelölését is. A minták stabilitását itt is DLS és ζ -potenciál mérésekkel igazoltuk. Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a TCP rendszerbe juttatása valamennyire növeli a részecskeméretet (5–16 %). A ζ -potenciál értéke a mintáknál +19,4–23,6 mV-nak adódott, tehát a NPs nem veszítettek stabilitásukból, és bebizonyosodott, hogy a hatóanyagot kapszulázó részecskék is sikeresen jelölhetők a NCs-vel.

Áttérve a rendszerek optikai jellemzőire, az utólagos jelölés sikerességét ellenőrzendő egy Horiba Jobin Yvon FluoroMax-4 készülékkel megvizsgáltuk az egyes minták emissziós intenzitását, az eredményeket a **28. A) és B) ábrán** mutatjuk be.



28. ábra: Az AIE megjelenése LYZ-Au NCs-vel való titrálás során A) az $m_{\text{Chit}}:m_{\text{HyA}} = 40:1$ összetételű komplex kompozit és B) a mag-héj szerkezetű kolloid részecskék esetén ¹³⁰

Minden sorozatnál öt-öt mintát választottunk a korábbi stabilitási vizsgálatoknál használt összetételekből ($m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}}$). Az emissziós görbék rögzítése után megvizsgáltuk az I/I_0 értékek változását, hogy láthassuk, milyen hatással van a jelölés a NCs fluoreszcenciájára. Az I_0 megállapításához szükségünk volt üres mintákra, amik a vizsgált közegben csak a NCs megfelelő koncentrációjú diszperzióját tartalmazták. A mérési eredmények alapján jól látható, hogy a fluoreszcencia erősödik a jelölési reakció hatására. Ez a hatás elenyésző BSA-Au NCs esetén (ábrát nem is mutatunk be), viszont szembeűnő a LYZ-mal stabilizált NCs-nél. A hordozó szerkezete nem befolyásolta a reakciót a BSA-nal stabilizált NCs-nél. A komplex kompozit hordozók esetén a LYZ-Au NCs használata a még kinetikailag stabil tömegaránynál (0,08) ~2,2-szeresére növelte az emissziós intenzitást (**28. A) ábra**), míg a mag-héj szerkezetű részecskékénél ~2,8-szeresére ($m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}} = 0,06$, **28. B) ábra**). A kiemelkedő növekmény mögött valószínűleg az ismert AIE jelenség állhat.

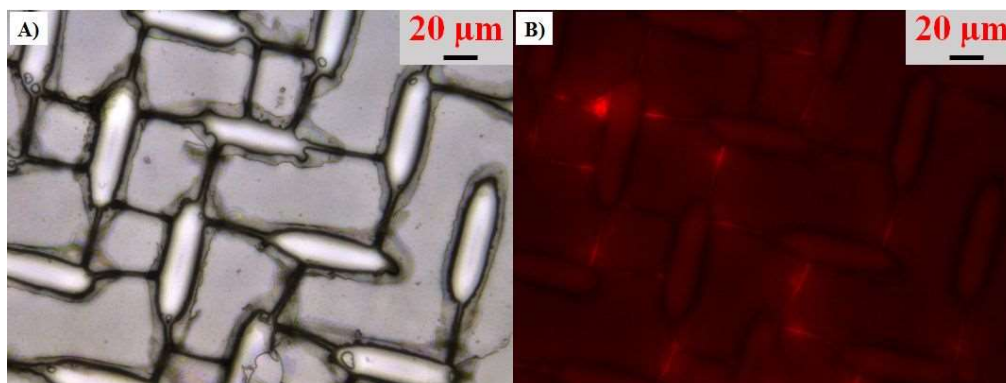
A hordozó NPs szerkezete és összetétele szerint összehasonlítva a jelölés eredményeit azt tapasztaltuk, hogy eltérések jelentkeznek az egyes minták között. Mag-héj szerkezetnél a felületen lévő nagyobb HyA mennyiség ($m_{\text{Chit}}:m_{\text{HyA}} = 40:1$ vs. $10:1$) miatt csak kevesebb NC-t lehet a felületen megkötni, így természetesen a fluoreszcencia intenzitása is kisebb lett. Ez a mennyiség valamennyire megnövelhető, ha a szintézissel egyszerre végezzük el a fluoreszcens jelölést is, itt viszont mérlegelnünk kell a korábban leírt, szerkezetre gyakorolt hatásokat. Fontos még megemlíteni, hogy azonos mennyiségű NC használata az eltérő

összetételű hordozóknál más stabilitást és méretet eredményez, hiszen a több HyA-at tartalmazó minták nagyobb intenzitással fluoreszkálnak, de ugyanakkor alacsonyabb a kolloidstabilitásuk, emellett méretük is nagyobb lesz. Összehasonlítva az eltérő szerkezet hatását egyforma Chit-HyA összetételnél azt láthatjuk, hogy a mag-héj szerkezet esetén nagyobb a fluoreszcencia. Ezeknél a részecskéknél nagyobb a HyA mennyisége a felületen, ezért a felületen nagyobb lokális negatív töltés van, emiatt a részecske nagyobb mennyiségű LYZ-Au NCs-t lehet képes megkötni.

A NCs típusa tekintetében megvizsgálva a jelölési reakciók közti eltérést, a LYZ esetén mért nagyobb fluoreszcencia értékek egyszerűen származhatnak a LYZ-Au NCs nagyobb mennyiségétől. Mivel a hordozók felületén a NCs sokkal sűrűbben helyezkednek el, mint egyébként a BSA-Au NCs képesek lennének, így az egyes objektumok közti lecsökkent távolság hatására kialakulhat az AIE jelenség. Az alkalmazott körülmények mellett (pH = 4,50) a szabad BSA molekula töltése közel esik annak i.e.p-jához ^{21,68}, míg a szabad LYZ i.e.p-ja ettől jóval messzebb, pH = 11 környékén található ⁷⁰. Ez alapján feltételezhető, hogy erősebb elektrosztatikus kölcsönhatás képes kialakulni a hordozó részecskék felületén lévő HyA-láncok és a NCs-et stabilizáló LYZ molekulák között, mint BSA-nal. Elméletünk szerint a NCs megkötődésekor a kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások merevebbé teszik a fehérje laza szerkezetét, a HyA molekulák közelsége a LYZ-Au NCs-hez pedig valamilyen módon erősíti azok emisszióját. Korábban láthattuk, hogy azok a hordozó részecskék, amelyek felületén több HyA található, kisebb méretnövekedést mutatnak a BSA- és LYZ-Au NCs jelenlétében is. Lehetséges, hogy a nagyobb kontaktus miatt a HyA molekulái jobban gátolják a LYZ esetén a NCs-et stabilizáló fehérje szabad mozgását. Ez magyarázhatja azt, hogy miért nem csökken a fluoreszcencia intenzitása BSA-Au NCs-nél és miért emelkedik drámaian a LYZ-Au NCs-nél, valamint hogy a nagyobb mennyiségű HyA-at tartalmazó mag-héj típusú hordozóknál miért volt erősebb a fluoreszcencia azonos mennyiségű NC alkalmazásakor is.

A jelölt részecskék esetén fontos volt meggyőződnünk a jelölés „erősségéről”, illetve hogy a jelölő milyen könnyedén távolítható el, mosható le a poliszacharid hordozóról. Meg akartunk emellett arról is bizonyosodni, hogy mekkora az a legkisebb NC-mennyiség, ami megbízhatóan mutat fluoreszcenciát. Ezek érdekében a jelöletlen részecskékből, illetve a legalacsonyabb koncentrációjú NC-t tartalmazó jelölt részecskékből a 4.3.2. fejezetben leírt nyomdázási technikával mintákat vittünk fel mikroszkóp tárgylemezre ¹³⁰. A megoldás

hatékony volt mind a jelöletlen, mind a közel semleges töltésű (sok aggregátumot tartalmazó) mintáknál (lásd a **29. ábra**).



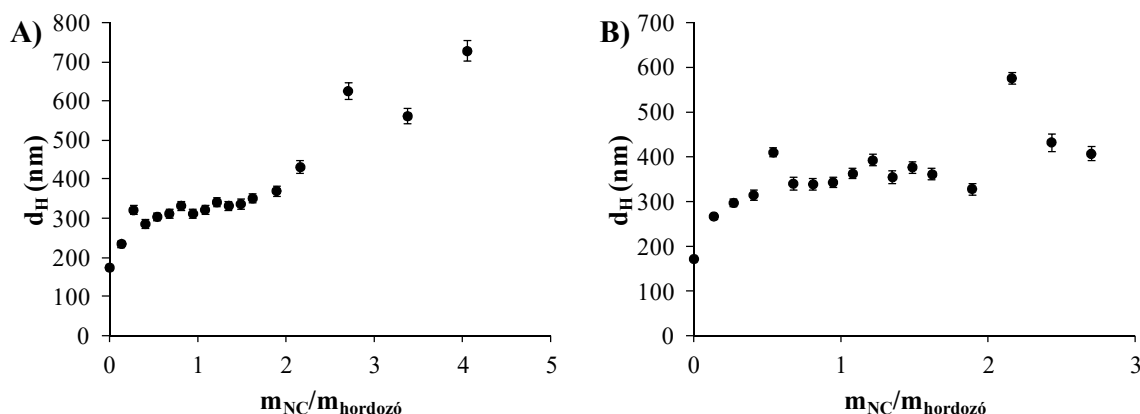
29. ábra: Fénymikroszkópos felvételek a $m_{\text{Chit}}:m_{\text{HyA}} = 10:1$ mag-héj részecskék LYZ-Au NCs-vel történő jelöléséről ($m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}} = 0,020$) A) felvétel normál megvilágítással, B) felvétel fluoreszcens módban (vörös színszűrővel, $\lambda = 650\text{--}750\text{ nm}$)¹³⁰

A jelöletlen hordozók a várákozásoknak megfelelően nem mutattak emissziót, ami azt is igazolta, hogy a részecskék nem rendelkeznek saját fluoreszcenciával. A kevés NC-t tartalmazó rendszereknél viszont nem volt elégséges a jelölő mennyisége, ott ugyanis nem volt látható a NCs jellegzetes színű sugárzása. Ezenél a mintáknál a részecskék destabilizálása érdekében NaOH-ot adtunk a mintákhoz, hogy annak segítségével aggregáltassuk a jelölt, gyengén fluoreszkáló hordozórészecskéket. A mintákról készült fényképek igazolták, hogy a NCs-vel elvégzett jelölés eredményes volt. Habár a NaOH által okozott destabilizálás megkeményítette a képződő aggregátumokat, már a kis mennyiségű Au NC is észlelhető mennyiségű emissziót produkált, ami bizonyította a NCs jelenlétét a hordozó részecskéken. A közel semleges töltésű jelölt részecskéknél a technika eredményesen erősítette az emissziót, ami azt is lehetővé tette, hogy az egyes rendszereket össze tudjuk hasonlítani. Azt tapasztaltuk, hogy a BSA-Au NCs-vel jelölt NPs-hez képest a LYZ-Au NCs mindegyik esetben erősebb emissziót adtak, ezzel igazolták a fluorimetriás eredményeinket. A látható eltérést okozhatta a LYZ-Au NCs nagyobb mennyisége (ezekből ugyanis több volt szükséges a töltésemlegesség eléréséhez), ezért megvizsgáltunk olyan mintákat, ahol a kétféle NC mennyisége megegyezett. Ebben az esetben is azt észleltük, hogy a LYZ-tartalmú minták mutatnak intenzívebb emissziót, tehát a jelölési kísérleteknél egyértelműen a LYZ-Au NCs bizonyultak jobbnak. A jelölés sikerességének igazolását követően megvizsgáltuk annak stabilitását is. Ehhez az egyes mintákat vízzel mostuk a tárgylemezre helyezés előtt és után is. Az első esetben a mintákat centrifugáltuk, majd a

felülúszó cseréje után a jelölt NPs-et visszadiszpergáltuk, és a tárgylemezre vittük a korábbi technikával. A másik módszernél a már a tárgylemezen lévő, beszárított mintára vizet cseppentettünk, ami feloldotta a maradék pufferből származó sókat, illetve a meg nem kötött vegyületeket. Elegendő oldási idő után a felületen lévő folyadékot eltávolítottuk, majd a mintát ismét kiszárítottuk. Mindkét eljárásnál megfelelő nagyságú volt a minták fluoreszcenciája az észleléshez, ami azt jelenti, hogy a hordozó és fluoreszcens jelölő között megfelelően erős kölcsönhatás alakult ki, hogy elkerüljük a tisztítás során azok kimosódását.

5.3.2. A kétfémes NCs kölcsönhatása a poliszacharid-alapú kolloid részecskékkel

A hordozó kolloid részecskék jelölését elvégeztük az újonnan előállított kétfémes Au/Ag NCs-ekkel is. A LYZ-Au/Ag NCs közül a LYZ-I rendszert használtuk, mert ennek emissziója közelebb esett a felhasználásnál preferált tartományhoz ($\lambda_{em} > 600 \text{ nm}$ ⁵⁷). Az egyes NC-hordozó tömegarányok esetén elsőként a kialakuló rendszerek méretét (d_H) vizsgáltuk, eredményeinket a **30. ábrán** mutatjuk be.



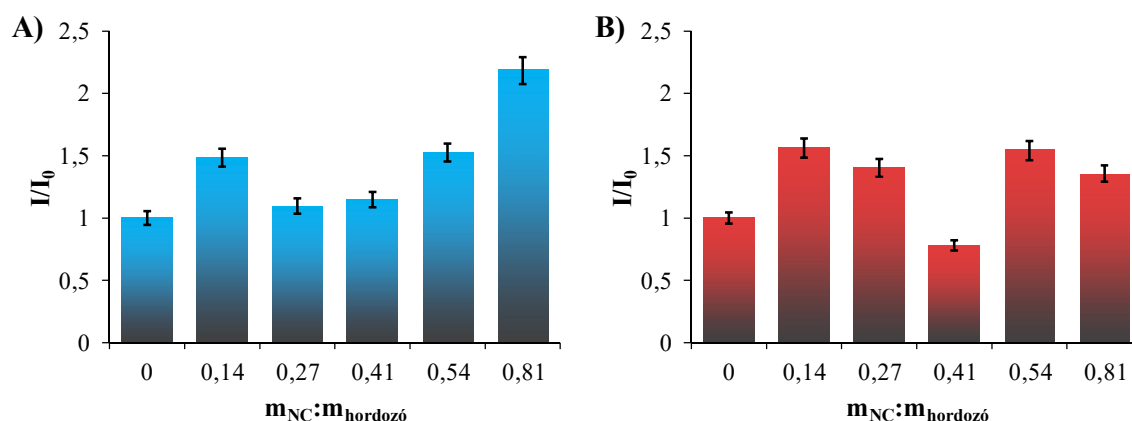
30. ábra: A mag-héj szerkezetű ($m_{Chit}:m_{HyA} = 40:1$) hordozó részecskék méretének (d_H) változása A) a BSA- illetve B) a LYZ-I-Au/Ag NCs hatására eltérő NC/hordozó tömegarányok kialakítása esetén¹³¹

A jelölés megvalósítása érdekében elsőként a mag-héj szerkezetű rendszert titráltuk a kétfémes NCs-ekkel. A minták mindkét vizsgált NC-nél nagy stabilitást mutattak, és viszonylag nagy mennyiségű NC-t lehetett a poliszacharid részecskékhez adni azok aggregációja nélkül. Ez jelentős eltérés a korábban vizsgált egyfémes Au NCs-től, ahol a rendszer 0,2 $m_{NC}:m_{hordozó}$ arány elérése előtt már teljesen aggregált és kiüledett. Nagyon magas tömegarányoknál, ahol a NC mennyisége már nagyobb a hordozóénál ($m_{NC}:m_{hordozó} > 1$), a rendszer továbbra is stabilnak tűnik, viszont látható mennyiségű üledék jelenik meg

a minták alján. A mag-héj típusú hordozónál (40:1 Chit-HyA arány) a BSA-Au/Ag NCs-ekkel történő titrálás közben a méret folyamatosan emelkedik 700–750 nm-ig, egészen a kétszeres NC mennyiségig ($m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}} \sim 2$) **(30. A) ábra)**, míg a LYZ-I-Au/Ag NCs-nél a méret csak 400 nm-ig emelkedik **(30. B) ábra)**. Az ülepedés mértéke elenyésző az egyes mintáknál, de természetesen árulkodik a stabilitás lecsökkenéséről. A látottak alapján erősen feltételezhető, hogy a poliszacharid részecskék nem képesek bizonyos mennyiségnél nagyobb NC-t felvenni, töltésük megszűnését követően destabilizálódnak és aggregálnak. Ez a jelenség is megerősíti azt a feltételezést, hogy a poliszacharid részecskék felületét nem lehet áttölteni. A szabad NCs ezzel szemben kinetikailag stabilabbak, de csak nagyobb NPs kialakulását követően maradnak szuszpendálva a közegben. Ha megnöveljük a HyA mennyiségét a hordozóban (10:1 tömegarány), az aggregáció már hamarabb, $\sim 1,5 m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}}$ tömegarány elérésekor jelentkezik, és a rendszer átlagos átmérője is nagyobb lesz (>1000 nm). A részecskék stabilitását a ζ -potenciál értékek megállapításával is igyekeztünk alátámasztani. Szinte minden esetben magas értékeket mértünk, pufferelt közegben +20 mV, Milli-Q vízben +60 mV körüli értékeket kaptunk az egyes titrálási pontokban. Ez az érték csak akkor csökkent észrevehetően, amikor a mintákban már kiülepedő aggregátumok jelentek meg. A mért magas ζ -potenciál értékek a rendszer stabilitásának értelmezésében olyan szempontból megtevesztőek, hogy ezek a rendszerre, és nem az egyes NPs-re jellemző adatok. Még abban az esetben is magas volt a mérhető érték, amikor már üledék képződött a minták alján, mert ekkor a műszer már csak a NCs-ből kialakult stabil NPs ζ -potenciálját mérte. A komplex kompozit típusú rendszerrel a DLS mérések hasonló eredményeket szolgáltatottak, mint az azonos összetételű mag-héj szerkezetű hordozónál. Egyfémű NCs alkalmazásakor a d_H jelentősen megnőtt $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}} = 0,07$ és $0,15$ tömegarány értékek felett, ezzel szemben az Au/Ag NCs bevetésekor a méret 250 nm körüli volt még $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}} = 3,0$ (BSA-Au/Ag NCs) és $2,0$ (LYZ-I-Au/Ag NCs) tömegaránynál is. Az itt mért ζ -potenciálok hasonlítottak a mag-héj részecskéknél mért értékekhez mind számértékben, mind a változás tendenciájában. Az eredmények alapján arra tudunk következtetni, hogy az Au NCs-hez hasonlóan a kétfémű NCs és a Chit-HyA hordozórészecskék is egyfajta „komplex” részecskét hoznak létre. Ezek a rendszerek magasabb kinetikai stabilitással rendelkeznek, mint az Au NCs-ekkel jelölt, azonos fehérjét használó rendszerek. A fehérjéket összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a NCs-et alkotó fématomok minőségétől függetlenül a LYZ esetén magasabb a kialakuló rendszerek stabilitása, ami a LYZ-mal stabilizált NCs alacsonyabb ζ -potenciáljának köszönhető.

Fluorimetriás méréseink alapján tudjuk, hogy a kétfémes NCs alkalmazásakor jóval stabilabb jelölt hordozórendszerek hozhatók létre, emellett a kétfémes NCs QY-a is jelentősen magasabb a tiszta Au NCs-hez képest. Összehasonlítva az egyes összetételek mellett a fluoreszcencia változását viszont azt láttuk, hogy az ilyen jelölés nem változtatja meg jelentősen az Au/Ag NCs által kibocsátott fény intenzitását (lásd **31. ábra**, összehasonlítva a szabad NCs-vel, lásd **28. ábra**).

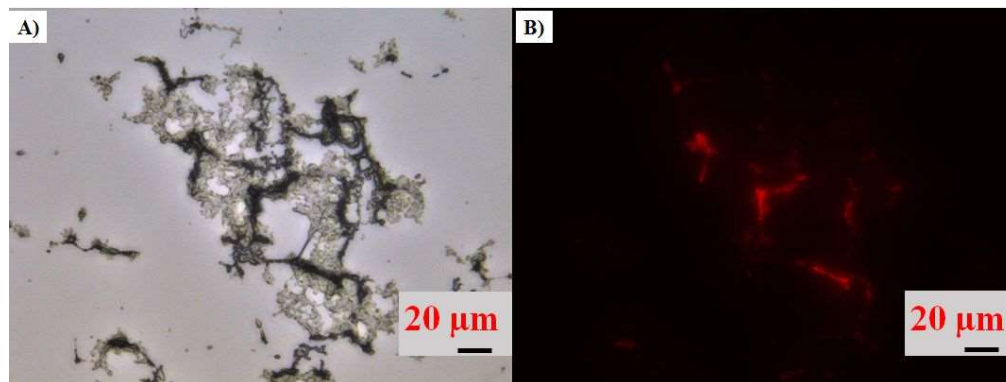
A kétfémes NCs-re vonatkozó fluorimetriás méréseink jó egyezést mutatnak a DLS eredményekkel, hiszen az AIE nem jelentkezik addig, amíg a rendszerben nem jelennek meg az aggregátumok. A fluoreszcencia értékek változása jól követi a DLS eredményekből meghatározott görbét. Nem tapasztalható jelentős változás az adatokban, illetve az észlelhető AIE sem kiemelkedő, csupán magas NC-hordozó tömegarányoknál (0,5 felett), ott is kifejezetten a BSA-Au Ag NCs + komplex kompozit hordozó rendszerénél. A kétféle szerkezetű hordozó és a BSA-nal stabilizált NCs reakciójában már viszonylag alacsony tömegarányok elérésekor keletkeznek aggregátumok, amit a DLS mérések is kimutattak.



31. ábra: A jelölés hatása a rendszer emissziós intenzitására: A) komplex kompozit hordozó részecskék jelölése BSA-Au/Ag NCs-vel B) és a mag-héj típusú hordozók jelölése LYZ-I-Au/Ag NCs-vel ¹³¹

A kialakított NC-rel jelölt hordozókat fluoreszcens mikroszkóppal is vizsgáltuk (**32. ábra**). A méréshez 2–2 ml ultrahanggal kezelt mintát centrifugacsövekbe töltöttünk, majd 12000 rpm sebességgel 10 percig centrifugáltunk. A felülúszó óvatos eltávolítását követően a mintákat Milli-Q vízben újra diszpergáltuk, és tárgylemezen beszárítva vizsgáltuk. Az eredményekből nem tudtunk kvantitatív következtetéseket levonni, viszont a fluoreszcens jelölés sikerességét igazolni tudtuk, emellett a jelölési reakció tisztítással szembeni ellenálló-képességét is megállapítottuk. Már kis mennyiségű NC hozzáadása

megfelelően nagy fluoreszcenciát biztosít a mintáknak, és nem volt szükséges további mintaelőkészítés sem (szemben az Au NCs-et használó mintákkal).

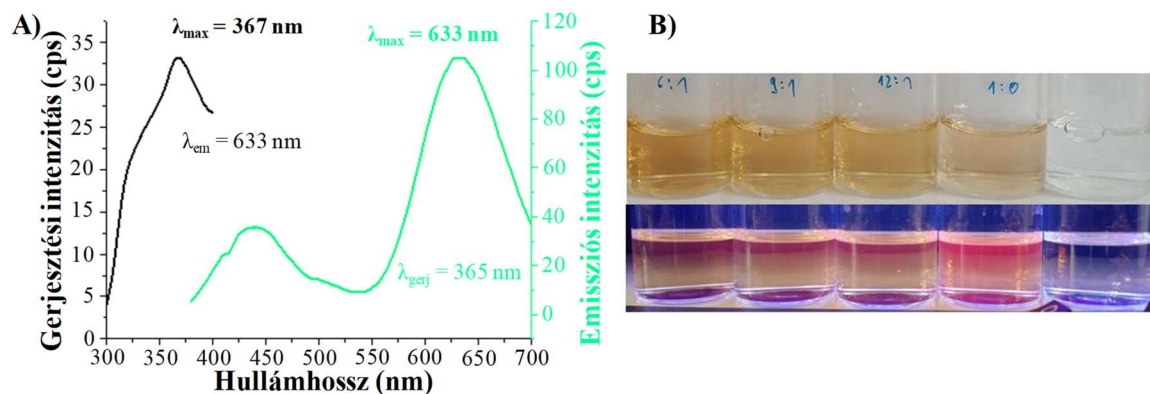


32. ábra: A $m_{\text{Chit}}:m_{\text{HyA}} = 10:1$ összetételű mag-héj NPs jelölése LYZ-I-Au/Ag NCs-ekkel, $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}} = 0,540$; A) normál és B) UV-megvilágítás mellett ¹³¹

5.4. γ G-nal stabilizált egy- és kétfémes NCs

5.4.1. Az előállítási protokollok kidolgozása

A kétfémes γ G-Au/Ag NCs előállításának kiindulási alapját a csoportunk által már korábban közzétett publikáció adta ⁴⁶, ezen Au NCs gerjesztési és emissziós színe a **33. A) ábrán**, míg a minta fényképei a **33. B) ábrán** láthatók (4. minta).



33. ábra: A) A NC-optimalizálás alapjául szolgáló γ G-Au NCs gerjesztési és emissziós színe ($n_{\text{Au}} = 5, 10 \mu\text{mol}$, $c_{\gamma\text{G}} = 15 \text{ mg}$ {5,91 ml mintában}, $t = 40^\circ\text{C}$) B) néhány, az $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}}$ arány megállapításakor nyert minta látható és UV-fény mellett készített felvételei ($n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 6:1, 9:1, 12:1$, a γ G-Au NCs és a tiszta γ G-oldat) ¹¹⁹

Az Au NCs szintézisének szembevető eltérés a BSA-hoz és LYZ-hoz képest, hogy a γ G fehérje nem oldódik fel teljesen vízben, emiatt hosszabb időt (2 óra) biztosítottunk a megfelelő oldódás, duzzadás elérésére. A HAuCl_4 -oldat hozzáadása valamennyire

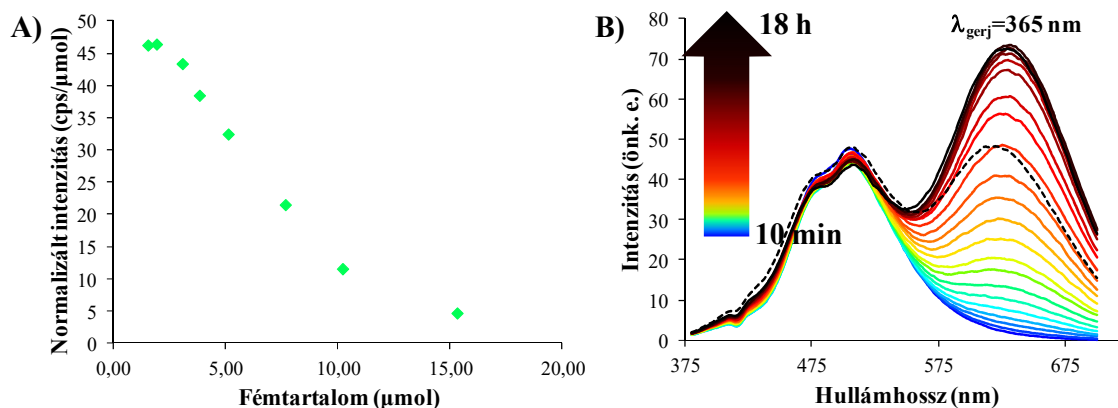
opálosabbá teszi az eddig is zavaros mintát, ez jelzi a kölcsönhatás kialakulását a fehérje és az Au(III) között. A NaOH hozzáadása után részben feltisztul a minta, színe sárgásabb lesz, majd 30 perc elteltével a maradék feloldatlan anyag is oldatba megy. A végtermék barnás színű, kifejezetten erős vörös emisszióval rendelkezik. A kétfémes NCs kialakításához első lépésként azt vizsgáltuk, hogy milyen hatással van a NCs emissziójára, ha az *Au atomokat szisztematikusan Ag atomokra cseréljük*, különös figyelemmel az Au-Ag 0,8:0,2–1:0 régióban, hiszen a korábbi NCs-nél is ez a tartomány bizonyult sikeresnek. A nagy Ag-tartalmú minták esetén kifejezetten alacsony intenzitású volt a fluoreszcencia, tiszta Ag esetén egyáltalán nem jelentkezett emisszió. Ebből arra következtethetünk, hogy az Ag kölcsönhatása a γ G-nal még rosszabb, mint a BSA vagy a LYZ esetén. Alátámasztja ezt a megfigyelést az AgNO_3 viselkedése a γ G-nal is. A fém só hozzáadására alig változik a minta megjelenése (Au esetén opálosodást láttunk), míg NaOH hozzáadására a minta gyorsan feltisztult. Ez a viselkedés teljesen megegyezik azzal, amikor fém sók nélkül készítünk el egy mintát, ahol a γ G a pH megemelése miatt teljesen feloldódott. Jól látható az **33. B) ábrán**, hogy a számunkra érdekes, nagyobb Au-tartalmú mintákban is az Ag jelenléte drasztikusan lecsökkenti az emissziós intenzitást már az atomok kevesebb, mint 10 százalékanak kicserélése után. Ezek a minták a többi fehérjénél tapasztaltakhoz hasonlóan már nagyon alacsony Ag-tartalomnál sárga színűek lesznek, szemben az Au NCs barnás színével. Egyetlen összetétel esetén sem tudtunk a kiindulásinál nagyobb fluoreszcenciát elérni, ezért a további munkához a lokális maximumnál lévő összetételt, az $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}}$ 0,911:0,089 molarányt választottuk ki.

Következőnek a minta *fehérjetartalmát* változtattuk 1 és 150 mg között (kiindulásként 15 mg-ot használtunk). Alacsonyabb tömegek esetén ($m_{\gamma\text{G}}:m_{\text{fém}} < 10$) csak plazmonikus NPs jöttek létre, az LSPR jelenség miatt jellegzetes mélyvörös színnel. Magasabb γ G tömegek alkalmazásakor már megjelent a NCs-re jellemző halványsárga szín. Ezzel párhuzamosan a minták fluoreszcencia értékei is folyamatosan emelkedtek, egészen a 90:1 γ G-fém molarány eléréséig. Ettől a ponttól kezdve további fehérje adagolása már nem növelte tovább az emissziós intenzitást, ezért a folytatáshoz a 90:1 arányt használtuk (pontosabban 90 mg γ G, 98,3:1:0,05 fehérje:Au:Ag tömegarány).

A továbbiakban széles tartományon (10–80 °C) tanulmányoztuk a szintézis *hőmérsékletének* hatását. A legmagasabb (80 °C) hőmérsékleten a fehérje teljesen aggregál, és barna színű csapadék keletkezik, ami nem rendelkezik vörös emisszióval. A következő, 60 °C-os mintánál halványabb csapadék keletkezett, és itt már jelentkezett kismértékű vörös

emisszió ($\lambda = 653$ nm). A 40 °C-os minta volt a kiindulási pont, ennél sárgás, csapadékmentes minta és erős vörös emisszió volt jellemző, az előző mintához képest kissé alacsonyabb hullámhosszoknál ($\lambda_{em} = 648$ nm). A 25 °C-os minta még halványabb színű, emissziója a narancs-vörös tartományba tolódott el ($\lambda = 627$ nm), és intenzitása magasabb. 10 °C-os előállítás mellett a minta a leghalványabb 24 óra után, emissziója 617 nm-nél maximális, színe 3 nap elteltével a 25 °C-on előállított mintáéra emlékeztet, és emissziós intenzitása is nagyjából azzal egyezik meg. A 24 órás reakcióidő 10 °C-on nem elég a NCs teljes kialakulásához, és a 25 °C-osnál nagyobb intenzitás sem érhető el, ezért ezt találtuk a legjobb paraméternek a következő kísérletek elvégzéséhez.

A teljes fémkoncentráció vizsgálata során (**34. A) ábra**) $1,53$ – $15,30$ μmol között vizsgáltuk a fémek teljes mennyiségét ($5,10$ μmol kiindulási értékkel). Magas fémtartalomnál a minta erőteljes színű, de emissziós intenzitása alacsony, még hígított mintákban is. Kisebb fémkoncentrációknál azt találtuk, hogy az alacsonyabb fémtartalom jelentősen növelte a normalizált (fémtartalomra vonatkoztatott) intenzitás értékét. Emellett jelentős vöröseltolódást is észleltünk ($\lambda = 633$ – 634 nm-re), ami az emissziós maximumot az Au NCs közelébe tolta el (636 – 637 nm). A legmagasabb emissziós értéket $1,91$ μmol fém alkalmazása esetén kaptuk, ezért ezt választottuk az utolsó, szintézisidőt ellenőrző méréshez.



34. ábra: A) A fémtartalom változtatásának hatása a kétfémes $\gamma\text{G-Au/Ag}$ NCs normalizált emissziós intenzitására ($n_{femion} = 1,53$ – $15,30$ μmol , $n_{Au}:n_{Ag} = 10,3:1$, $c_{\gamma\text{G}} = 90$ mg oldva { $5,91$ ml mintában}, $t = 25$ °C). B) A $\gamma\text{G-Au/Ag}$ NCs emissziós színekének változása a szintézisidő előrehaladtával ($n_{femion} = 1,91$ μmol , $n_{Au}:n_{Ag} = 10,3:1$, $c_{\gamma\text{G}} = 90$ mg oldva $5,91$ ml mintában, $t = 25$ °C; szaggatott vonal: 24 h)¹¹⁹

A szintézisidő követésével azt észleltük, hogy a kezdetben erősen opálos minta a NaOH hozzáadására elég gyorsan, pár perc alatt feltisztul, színe halványsárga, ami a NC-képződés

során egyre sötétebb lesz. A legmagasabb fluoreszcencia intenzitást 12–18 óra esetén érjük el (**34. B) ábra**), de későbbi mérések bizonyították, hogy 24 óra alatt is lehetséges ilyen magas intenzitás elérése, ezért gyakorlati okokból a szintézisidőt nem változtattuk az eredeti értékhez képest. Viselkedésében ez a rendszer leginkább a BSA-Au/Ag NCs-hez hasonlított, mivel itt sem láthattuk a fehérjéhez tartozó csúcs növekedését, mint a LYZ-tartalmú rendszereknél, továbbá itt is jelentkezett az intenzitás csökkenése 24 óra eltelte után, de ezt a minták fényérzékenységének is be lehet tudni.

5.4.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése

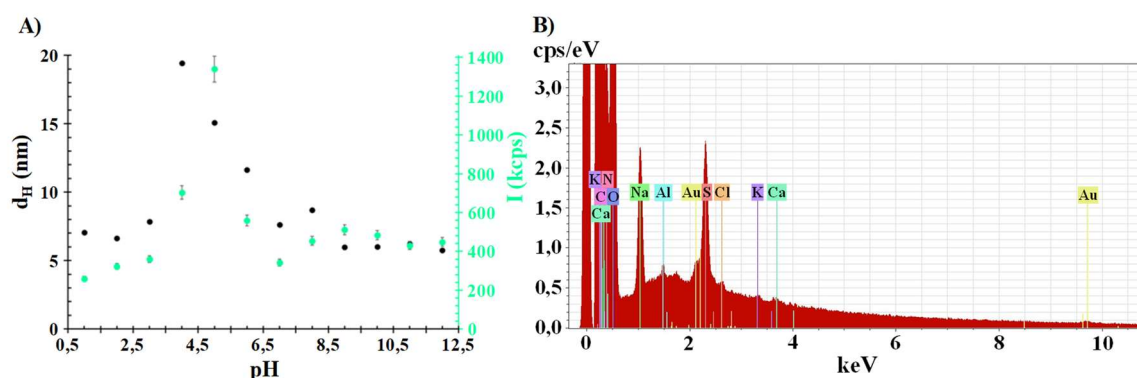
A kialakított, tisztított γ G-Au/Ag NCs optikai tulajdonságait, illetve kolloidstabilitását is vizsgáltuk későbbi felhasználások érdekében. A NCs biológiai aktivitására szolgáló méréseket az 5.5.4. *Biológiai aktivitást mérő vizsgálatok* fejezetben foglaltuk össze. A NCs gerjesztési hullámhossza 367 nm-nek, emissziós maximuma 636 nm-nek adódott. Az Au NCs-hez képest a fémtartalomra vonatkoztatott emissziós intenzitás 2,3-szeresére emelkedett. A kvantumhasznosítás értéke $2,31 \pm 0,29 \%$ lett, ami átlagosnak tekinthető a NCs körében, de alacsonyabb a korábbi BSA- és LYZ-Au/Ag NCs értékeinél. Az élettartammérésekkel az emissziós maximumon három komponenst sikerült beazonosítani. Az első $2,7 \pm 0,5 \mu\text{s}$, a második $1,259 \pm 0,071 \mu\text{s}$, a harmadik $99,7 \pm 37,5 \text{ ns}$ lett. Ezek közül az utolsó, ns-os komponens a NCs fém-fém átmenetéhez tartozhat, pontosabban a fémmagokban lévő Au-Ag atomokhoz. A másik két komponens egy-egy ligandum töltéstranszfer folyamathoz rendelhető. A méréseket újból, szélesebb tartományon is elvégeztük, és az élettartamokat alaposabban elemezve megállapítottuk, hogy a legnagyobb tag $1,22\text{--}1,91 \mu\text{s}$, és az $580\text{--}740 \text{ nm}$ tartományon mérhető jól (**F5. táblázat**). Ennek a tagnak 740 nm -en ($\tau = 1,39 \mu\text{s}$) közel teljes a hozzájárulása, amit jól jelez a $\chi^2 = 1,070$ illesztési paraméter is. A második tag széles tartományon mozog, $\tau_2 = 321,7\text{--}503,9 \text{ ns}$ között, és még 540 nm -en is jól kimutatható, ami jelzi, hogy az ehhez az átmenethez tartozó emissziós hullámhossz alacsonyabban található a $\tau_1 \lambda_{\text{em}}$ értékénél ($\text{S} \rightarrow \text{Au}$ LMCT vagy LMMCT). A harmadik tag $9,23\text{--}36,77 \text{ ns}$ között mozog, nagy valószínűséggel valamilyen fehérjéhez tartozó átmenethez tartozhat, amit a 460 nm -nél található csúcs elemzése bizonyíthat. Ezen a tartományon ($\lambda_{\text{em}} = 440\text{--}480 \text{ nm}$) három és négy paraméter illesztése is elég megbízható eredményt ad ($\chi^2 = 1,20\text{--}1,80$ vs $1,06\text{--}1,12$, lásd az **F6. táblázat**). Összehasonlítva a Trp korábban is ismertetett értékeivel ¹³⁸ látható, hogy itt is megjelennek mind a Trp saját (2 db),

mind a környezet hidrofób jellegétől függő tagok. A negyedik tag ($\tau_4 = 9,07\text{--}10,30\text{ ns}$) megegyezik az 540 nm-en mért legkisebb taggal, beazonosítása nem volt sikeres.

A NCs méretére DLS mérések alapján $d_H = 6,82 \pm 0,97\text{ nm}$ adódott, ami igen hasonló az Au NCs-hez, mint ahogy azt a korábbi publikáció is igazolja ⁴⁶. A nagy méret oka a fémmagokat körbevevő fehérjeburok, ami oldatban nagymértékben képes duzzadni, jelentősen megnövelve ezzel a rendszer d_H értékét. Kiegészítő HRTEM mérésekkel eredményesen meg lehetett határozni az egyedi fémmagok méretét, ezek jóval kisebb, $1,61 \pm 0,54\text{ nm}$ -es átmérővel rendelkeznek. Ez az eredmény sem meglepő, hiszen a BSA- és LYZ-Au/Ag NCs-nél is hasonlóak voltak a tapasztalataink.

A gyakorlati felhasználás szempontjából megvizsgáltuk, hogy a tárolás milyen hatással van a minták stabilitására. Ehhez a kísérlethez tisztítatlan és tisztított diszperziókat, illetve beszárított anyagot is vizsgáltunk szobahőmérsékleten ($25\text{ }^\circ\text{C}$), hűtött ($10\text{ }^\circ\text{C}$) és fagyasztott állapotban is ($-20\text{ }^\circ\text{C}$), emellett fénytől védett és fénynek kitett környezetekben is (csak $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on). Ebben a kísérletsorozatban csak vizuális tapasztalatainkat gyűjtöttük össze, ezért pontos következtetések levonásához további, műszeres mérések elvégzése is szükséges. A fénykitettség jelentősen képes csökkenteni az emissziós intenzitást, ezért a mintákat mindig fénytől védve kell tárolni. Ez a hatás az Ag jelenléte miatt nem meglepő, hiszen jelenléte erősen megnöveli a minták fényérzékenységét. A liofilizált NCs esetén a mélyhűtött ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) és szobahőmérsékletű tárolás is kivitelezhető, feltéve a nedvességtől való védelmet. Ha a mintát nedvesség éri, akkor hidrogél vagy tömény diszperzió jön létre, ami erősen befolyásolja a stabilizáló fehérje másodlagos szerkezetét, és aggregációt idézhet elő. Száraz környezetben a szilárd anyag fluoreszcenciája sokáig megmarad lényegi degradáció nélkül, fagyasztott mintáknál akár hónapokig, míg szobahőmérsékleten legalább egy hétig. A szilárd minta esetén is elengedhetetlen a fény kizárása az optikai jellemzők minél jobb megőrzése érdekében. Feloldott formában sokkal nehezebb a tárolás, tisztított formában az idő lehetőleg minél rövidebb legyen, és csak hűtött formában ($4\text{ }^\circ\text{C}$) lehetséges. Hosszabb tárolás esetén célszerű a tisztítatlan mintát tárolni, és közvetlenül felhasználás előtt megtisztítani. A tárolási idő során csökken a fluoreszcencia intenzitás, és a fehérje stabilitásvesztése is jelentős, amit a mintában megjelenő aggregátumok is jeleznek. Ez a folyamat szobahőmérsékleten már 24 óra alatt bekövetkezik, míg hűtött tárolásnál egy hét elegendő a fehérje degradációjához. A tisztítatlan minta magas pH-ja védelmet biztosít a mikrobiológiai degradációval szemben, ami fehérjetartalmú anyag révén az egyik legnagyobb probléma a tárolás során.

A kétfémes NCs kialakulásának, azaz a fém jelenlétének hatását a γ G fehérje töltésére áramlási potenciál mérésével is meghatároztuk. Ezen méréseink azt mutatták, hogy a fémmag megjelenése a fehérjében jelentősen eltolja annak izoelektromos pontját, értéke 6,5-ről $\sim$ 5,6-ra változott ⁷⁵. Ennek oka az lehet, hogy a fehérje számos, töltéssel rendelkező csoportja részt vesz a NC-magok stabilizálásában, így ezek az aminosavak a kötések kialakításával elveszítik töltésüket, megváltoztatva a rendszer i.e.p értékét. Ha a NCs optikai és kolloidstabilitását a pH függvényében vizsgáljuk (lásd **35. A) ábra**), jól látható az i.e.p közelében a NCs instabilitása, amit a megnövekedett méret és fluoreszcencia intenzitás is jelez. Az utóbbit az aggregációindukált emisszió (AIE) okozta, míg az előbbinél nincs túl látványos változás, a 7 nm-ről 20 nm-re történő méretnövekedés jelzi, hogy az adott mérési pont távolabb esik a tényleges i.e.p.-tól. A pH hatása mellett elemeztük az ionerősségét is, ennek hatása nem volt jelentős a NCs emissziós spektrumára.



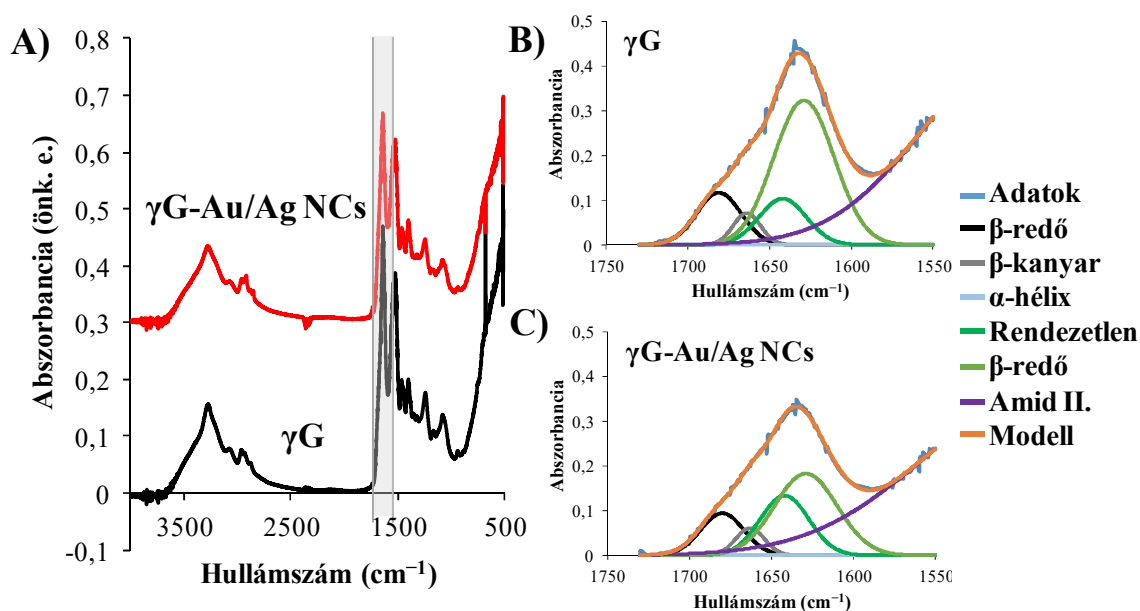
35. ábra: A) A γ G és a γ G-Au/Ag NCs d_H és a 634 nm-en megjelenő emissziós maximum intenzitás értékeinek a változása a pH függvényében B) a γ G-Au/Ag NCs SEM-EDX spektruma ¹¹⁹

A fémtartalom vizsgálatához SEM-EDX méréseket végeztünk, eredményei a **35. B) ábrán** láthatók. A szilárd mintákban csak az Au jelenlétét tudtuk kimutatni, mert az Ag koncentrációja túl alacsony volt. A NCs tényleges fémtartalmának megállapítására elvégzett ICP-MS mérések alapján a minták Au-tartalma valamelyest csökkent a tisztítás hatására, míg az Ag-tartalom változása jóval kisebb. A fémek anyagmennyiségének aránya a tisztítás hatására a névleges 91,1:8,9-ről 89,1:10,8-ra változott.

A NCs-ben lévő fémek oxidációs állapotát XPS mérésekkel ellenőriztük. A SEM-EDX mérésekhez hasonlóan itt is csak az Au-at tudtuk vizsgálni, és megállapítottuk, hogy az döntő mértékben Au^0 oxidációs állapotban van jelen a mintában. Az Ag-öt nagy valószínűséggel a minta magas fehérjetartalma, illetve a nagyon alacsony Ag mennyiség miatt nem tudtuk

detektálni. Au esetén jól kivehetők voltak az Au 4f_{7/2} és 4f_{5/2} csúcsok 84,05 eV és 87,80 eV értékeknél, amik jó egyezést mutatnak a fém Au-ra vonatkozó értékekkel. Mivel mintáinkban jól beazonosítható a S→Au(I) töltésátmenet, így az XPS eredményekkel kombinálva egyértelmű, hogy valamennyi Au(I) is jelen van a mintákban.

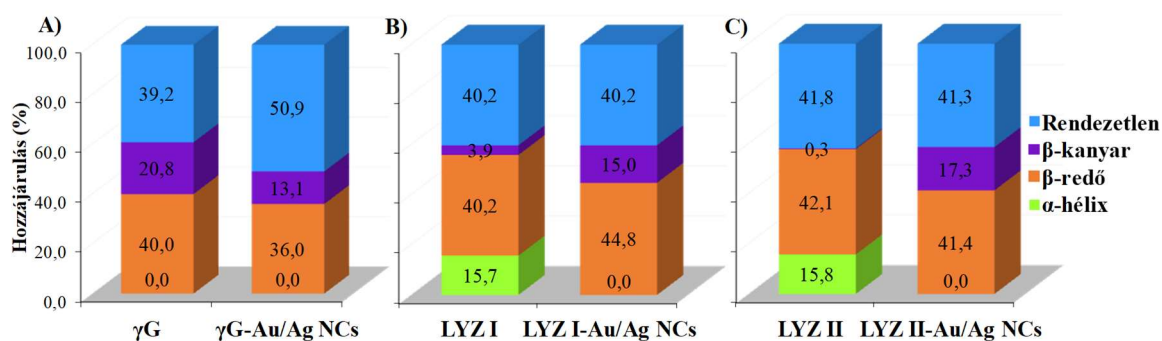
A NCs elektrokémiai sajátosságait Ungor Ditta vizsgálta, ahol megállapította, hogy csak egyetlen oxidációs csúcs jellemzi a mintát 0,551 V-nál (0,1 M KCl-ban, referenciaelektród: Ag/AgCl). Ez a csúcs egyértelműen jelezheti a fémötvözet kialakulását, hiszen Au NCs esetén legalább két oxidációs csúcs található (itt 0,562 V és 0,725 V értékeknél ¹³⁹), ráadásul a kétfémes NCs jóval nagyobb elektrokémiai aktivitást mutatnak az Ag-atomok jelenléte miatt. A fehérje másodlagos szerkezetének vizsgálatához FT-IR és CD méréseket végeztünk (36. és 37. ábra).



36. ábra: A) A γ G fehérje és γ G-Au/Ag NCs FT-IR spektrumai és B) és C) Az amid I. csúcs felbontása az 1730–1550 cm⁻¹ tartományban ¹¹⁹

Az FT-IR esetén az amid I. csúcs (maximuma 1631 és 1635 cm⁻¹ értékeknél a γ G és a NCs esetén) vizsgálatával meg tudtuk állapítani az egyes másodlagos szerkezeti elemek arányát. A méréshez az IR adatokat az 1730–1550 cm⁻¹ tartományban elemeztük (36. B) és C) ábra), az értékekhez az alapvonalat a mérés legkisebb abszorbanciaértékének választottuk meg. A β -redő két helyen jelentkezik 1691–1680 és 1642–1621 cm⁻¹ között, az α -hélix 1657–1653 cm⁻¹ között, a β -kanyar 1677–1661 cm⁻¹ között és a rendezetlen szerkezet 1657–1642 cm⁻¹ között. A csúcsfelbontás pontossága érdekében az amid II. csúcsot is

felhasználtuk (maximuma 1499 és 1486 cm^{-1} , nem egyezik meg a valós mért értékekkel, lásd **36. A) ábra** (kiemelve)). A NC-képződés hatására csökken a β -redő és β -kanyar hozzájárulása is a mintákban, míg a rendezetlen szerkezeté megnő, jelezve a kiindulási γG szerkezetének rendezetlenné válását. A α -hélix változása elhanyagolható mértékű, az elem alapvetően nem is jellemző a fehérjére, mint az a szakirodalomból jól látszik (2–7 % IgG fehérjében ¹⁴⁰). A CD spektroszkópiai mérések hasonló eredményeket szolgáltatottak a **37. A) ábra** és a **4. táblázat** alapján, miszerint az α -hélix hozzájárulása nem kimérhető, míg a NC-képződés hatására ez a mérés szerint is csökken a β -redő, emellett a β -kanyar hozzájárulása, míg jelentősen nő a rendezetlen szerkezeté. A mérések jelentős különbséget mutattak a korábbi fehérjékhez képest (**23. ábra**, **37. B) és C) ábra**), mivel azoknál az α -hélix volt az a szerkezeti elem, ami közel eltűnt a NC-magok jelenlétében, és a β -redő elemek közel változatlanok maradtak, míg itt pont ezek hozzájárulása csökkent jelentősen.



37. ábra: A) A γG - B) LYZ-I- és C) LYZ-II-Au/Ag NCs esetén a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek megoszlása a CD spektrumok Reed-modell szerinti kiértékelése alapján a szabad fehérjék megfelelő adataival ^{119,131}

4. táblázat: A γG és a $\gamma\text{G-Au/Ag NCs}$ másodlagos fehérjeszerkezetének kvantitatív meghatározása az FT-IR adatok kiértékelésével (felső sorok) és a CD görbék Reed-modell szerinti elemzésével (alsó sorok) ¹¹⁹

<i>IR</i>	α -hélix	β -redő	β -kanyar	Rendezetlen
γG	0,0	43,3	16,2	40,5
$\gamma\text{G-Au/Ag NCs}$	0,0	33,0	14,2	52,8
<i>CD</i>	α -hélix	β -redő	β -kanyar	Rendezetlen
γG	0,0	40,0	20,8	39,2
$\gamma\text{G-Au/Ag NCs}$	0,0	36,0	13,1	50,9

5.5. Tf-nel stabilizált egy- és kétfémes NCs

5.5.1. Az előállítási protokollok kidolgozása

A Tf-Au/Ag NCs fejlesztésénél célunk a fémtartalomra vonatkoztatott legnagyobb fluoreszcencia intenzitás elérése volt. Ennek érdekében a Tf-Au NCs szintézisét a következő paraméterek változtatása mellett végeztük el: $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}}$ molarány, Tf-fém tömegarány, hőmérséklet, teljes fémkoncentráció és szintézisidő. A Tf elég költséges fehérje, így a kísérleteket kis mintatérfogatban (1,1 ml), kevés Tf (1,5 mg) felhasználásával készítettük el. A Tf-Au NCs alapjául szakirodalmi források szolgáltak^{28,76}, ezeket módosítottuk a kétfémes származékok előállítása érdekében.

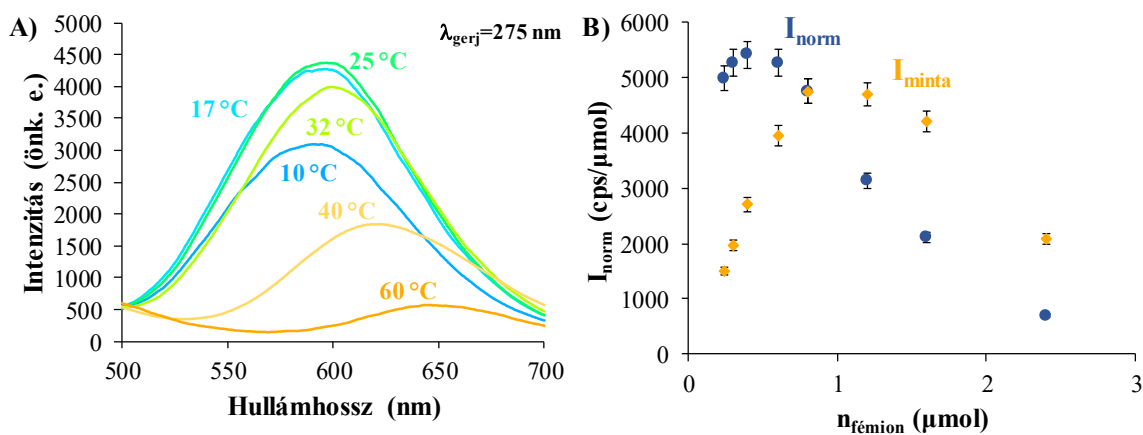
Az *Au-Ag arány* változtatását a Tf-Au/Ag NCs-nél csak a 4:1–1:0 ($n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}}$) tartományon vizsgáltuk a korábbi kétfémes NCs-nél szerzett tapasztalatokra támaszkodva (magasabb Ag-tartalom minden esetben csökkentette a fluoreszcenciát). A vizsgálat során nem változtattuk a fehérje koncentrációját (1,36 mg/ml), a hőmérsékletet (40 °C), a fémkoncentrációt ($n_{\text{fémion}} = 0,80 \mu\text{mol}$) és a szintézisidőt (24 óra). A mérések alapján az Au atomok szisztematikus cseréje eleinte növelte, majd a 9:1 arány elérékor állandósította, utána csökkentette a mérhető intenzitás értékét. A maximumot (közel azonos értéket tartva) tehát a 9:1–8:1 tartományon találtuk, ezért a további mérésekhez a középértéket, a 8,5:1 Au-Ag arányt használtuk.

A második lépésben csak a *fehérje koncentrációját* változtattuk egy szűkebb tartományon, pontosabban 1,09–6,00 mg/ml (1,2–6,6 mg Tf) között, itt is a korábbi eredményeinket követve. A mérések alapján látható volt, hogy a fehérjetartalom csökkenésével csökkent a fluoreszcencia (még alacsonyabb koncentrációknál feltételezhetően már NPs képződnének, hasonlóan a BSA, LYZ és γG esetéhez), míg a növelésével megduplázható az emissziós intenzitás értéke. Ha a koncentrációt 4,91 mg/ml fölé (5,4 mg Tf) emeljük, akkor már nem tapasztalható érdemi emelkedés, ezért ezt a koncentrációt választottuk a további vizsgálatokhoz.

A következő sorozatnál a szintézis *hőmérsékletének* hatását értelmeztük (**38. A) ábra**). Több különböző értéket választottunk a méréseinkhez, ezzel pontosabban meghatározva a hatást: +10 °C (hűtőszekrény), +17 °C (vízhűtés), +25 °C (termosztált laborhőmérséklet), +32 °C (vízfürdő), +40 °C (eredeti érték) és 60 °C. Az utóbbi érték esetén a korábbi eredmények alapján arra számítottunk, hogy az emelt hőmérséklet a NCs képződésére negatív hatással lesz, hiszen megváltoztatja a fehérje másodlagos szerkezetét. A szintézisek eredményei alapján elmondható, hogy az alacsonyabb hőmérséklet (40, 32 és

25 °C) elősegítette a NCs képződését, hiszen magasabb emissziós intenzitásokat sikerült elérni, ráadásul a maximum értéke 25 °C-on 620 nm-ről 595 nm-re eltolódott. Alacsonyabb hőmérsékleteken (17 és 10 °C) szintén nagy fluoreszcencia volt tapasztalható (kis maximumeltolódás mellett), viszont a szobahőmérsékletű reakcióhoz képest rendre alacsonyabb értékeket kaptunk, ezért a további kísérleteket már 25 °C-on hajtottuk végre.

A *fémkoncentráció* változtatásakor az $n_{Au}:n_{Ag}$ arányt változatlanul hagytuk (8,5:1), és a teljes koncentrációt 0,24–2,40 μmol között vizsgáltuk (**38. B) ábra**). Eredményeink azt mutatták, hogy ennek a paraméternek hatása van mind az intenzitásra, mind az emissziós csúcs helyzetére.

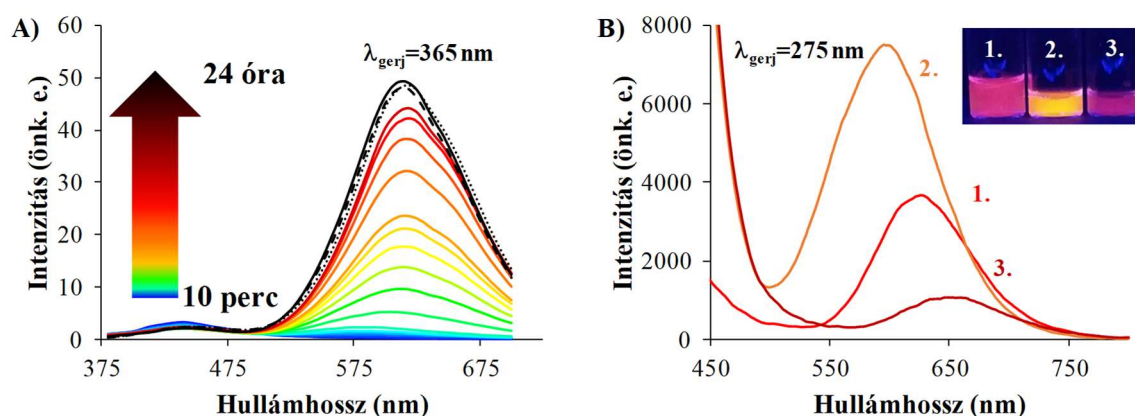


38. ábra: A) A hőmérséklet hatása a Tf-nel stabilizált kétfémes NCs emissziós színekére ($n_{femion} = 0,40 \mu\text{mol}$, $n_{Au}:n_{Ag} = 8,5:1$, $c_{Tf} = 0,54 \text{ mg oldva } \{1,1 \text{ ml}\}$ mintában, $\lambda_{gerj} = 275 \text{ nm}$) B) a teljes fémtartalom hatása a Tf-Au/Ag NCs saját (I_{minta}) és a fémkoncentrációra normalizált fluoreszcencia intenzitására (I_{norm})¹⁴¹

Az abszolút emisszió tekintetében (I_{minta}) nem sikerült jelentős változást elérni, 1,20 μmol esetén tapasztaltunk a kiindulási mintával közel egyező értékeket, míg a többi esetben alacsonyabb volt ez az érték. Ha azonban a minta fémtartalmával normalizált intenzitás (I_{norm}) értékeket vizsgáljuk, jól látható, hogy jelentős emelkedést érünk el a fémtartalom kb. felére csökkentésével (0,40 μmol). Ennek hatása volt a maximum helyére is, azt a kezdeti 599 nm-ről 606 nm-re tolta el, tehát a γG -hoz hasonlóan itt is vöröseltolódást okoz, ha a fehérjéből kevesebbet használunk a NCs előállításához.

Utolsó lépésben a *szintézis idejét* vizsgáltuk (**39. A) ábra**). A szintézis kezdetekor (a NaOH hozzáadása után) már látható volt a fehérjére jellemző csúcs, ennek intenzitása jelentősen csökkent 60 percig, majd ezután stabilizálódott. Ez a jelenség mögött egy fluoreszcens intermedier átalakulása, vagy a fémionok által a fehérje emittáló centrumokra

(Trp aminosav) gyakorolt kioltó hatása állhat. A NC-re jellemző csúcs eleinte lassan jelent meg 580 nm környékén, és 60 perc után vöröselölódás kíséretében (~580 nm→613 nm) meredeken emelkedni kezdett. A maximum helyzete kb. 2 óra eltelte után már nem változott jelentősen, viszont az intenzitás meredeken emelkedett kb. 4 órán át, majd 12 óra után már alig változott. A legmagasabb értéket 18 óra után kaptuk, de 24 és 48 óra, sőt 5–7 nap elteltével is közel azonos értékeket mértünk, így praktikus okokból a 24 órát választottuk.



39. ábra: A) A Tf-Au/Ag NCs emissziós spektrumai adott szintézisidő esetén ($n_{\text{fémion}} = 0,40 \mu\text{mol}$, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 8,5:1$, $c_{\text{Tf}} = 5,4 \text{ mg } \{1,1 \text{ ml mintában}\}$, $t = 25^\circ\text{C}$; szaggatott vonal: 5 nap, pontozott vonal: 7 nap) B) a kiindulási Tf-Au NCs (1.), az optimalizált Tf-Au/Ag NCs (2.) és az optimalizálás körülményeivel elkészített Tf-Au NCs (3.) emissziós színe, és a minták fényképe UV-megvilágítás mellett ¹⁴¹

Az optimalizálás sikerességét a következő módon ellenőriztük: elkészítettük a szakirodalmi forrást felhasználva a Tf-Au NCs-et ²⁸, az újonnan kidolgozott eljárással a Tf-Au/Ag NCs-eket és egy olyan mintát, amiben az általunk optimalizált paraméterek mellett csak Au atomok vannak (hasonló mérést a BSA-Au/Ag NCs-kel is elvégeztünk). Ennek a mintának az összetétele a következő: 5,4 mg Tf-t 960 μl vízben oldottunk fel, ehhez 40 μl 10 mM HAuCl₄ törzsoldatot adtunk, 5 perc keverés után 100 μl 1 M NaOH oldatot adtunk hozzá, és a NCs szintéziséhez a mintát 25 °C-on kevertetés nélkül, fénytől elzárva 24 óra ideig hagytuk. A három előállított mintát azonos körülmények mellett (275 nm gerjesztési hullámhossz, 2,5 nm résszélesség, 200 nm/min pásztázási sebesség) fluoriméterrel vizsgáltuk meg. A **39. B) ábrán** bemutatott eredményekből jól látszódott, hogy az optimalizálás több mint négyszeresére növelte a fémtartalomra vonatkoztatott intenzitás értékét, illetve erős kékeltolódást okozott 626 nm-ről 595 nm-re. A harmadik mintával összevetve kiemelkedő az ezüstionok szerepe az emisszió tekintetében. Hiányuk jelentősen rontja a NCs intenzitás értékeit (58 %-a a kiindulási Tf-Au NCs-nek), illetve

komoly vöröseltolódást is okoz 652 nm-re. Az eredmények bizonyítják, hogy a kétfémes NCs jelentősen jobb optikai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint egyfémes társaik, és ebben az előállítási körülmények általunk elvégzett optimalizálása meghatározó feltétel.

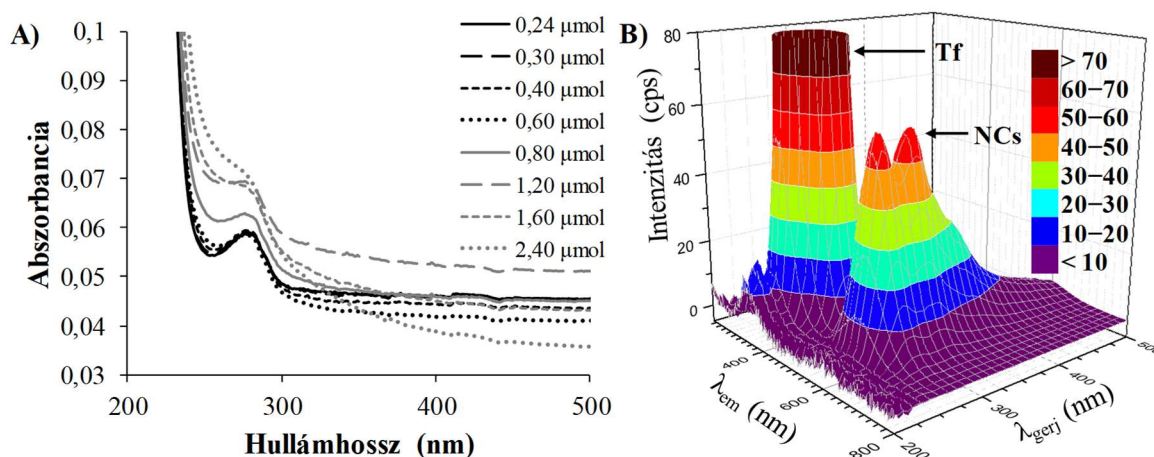
5.5.2. Az előállított egy- és kétfémes NCs jellemzése

Az előállított Tf-Au és Au/Ag NCs-et először UV-Vis fotometria segítségével jellemeztük. Az Au NCs abszorbancia színeképén több, jellegzetes elnyelési sáv is látható volt, az első 280-290 nm, a második 245 nm, a harmadik 225 nm körül jelentkeznek; a közbenső csúcs elég egyedi, ennek jelenléte csak az Au NCs-re jellemző²⁸.

A hőmérséklettől való függés vizsgálatakor is megmértük a 10, 25 és 40 °C-on előállított minták UV-Vis abszorbancia spektrumát. A méréseket három koncentráció mellett (eredeti, tízszeres és százszoros hígítás) végeztük el. A NC-mintáknál nem található egy esetben sem kifejezetten a NC-gerjesztéshez tartozó elnyelési maximum, inkább csak egy exponenciális emelkedés látszik az alacsonyabb hullámhosszok irányában. Ez leginkább a szóró centrumok megjelenésével magyarázható. Az eltérő koncentrációjú méréseknél feltűnő, hogy a 40 °C-on készített minta elnyelése jóval nagyobb, mint a másik kettőé. Százszoros hígításnál azt tapasztaltuk, hogy nagyon kis hullámhosszokon (200–235 nm) a 10 és 25 °C-os minták mutatnak nagyobb elnyelést. A detektált fluoreszcencia intenzitással összhangban ebben a tartományban láthatók hasonló változások, mert az abszorbancia a 25 °C-os mintánál a legnagyobb, ezt követi szorosan a 10 °C-os, és jóval lemaradva a 40 °C-os. Az alacsonyabb abszorbancia arra enged következtetni, hogy ezeknél a mintáknál kevésbé hatékony a NCs gerjesztése (ezzel együtt a fényelnyelés is), így természetesen alacsonyabb az emissziós intenzitás is. Ha megvizsgáljuk a spektrumokat 100x hígítás mellett, akkor a fő (275 nm) csúcs mellett egy másikat is felfedezhetünk, ami vállként jelenik meg 225-227 nm környékén.

Hasonlóan elemeztük a fémtartalom vizsgálata esetén is az elnyelési spektrumokat, és jelentős eltéréseket láttunk az egyes minták között. Minél nagyobb volt a felhasznált fém mennyisége, nem meglepő módon annál nagyobb lett a minta abszorbanciája is, viszont a színekép egyre inkább kisimult, ami a szerkezeti rendezettség hiányára utalhat (különösen a fehérjére vonatkoztatva). A spektrumon két kisebb maximum is látható itt, egy 282, egy pedig 289 nm-nél, ezek a Trp és Tyr $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenetei lehetnek^{28,112}. Tízszeres hígításnál (lásd **40. A) ábra**) hasonló a tendencia, a legkisebb elnyelés a 0,24 μmol fémmel készült mintáé volt, százszoros hígításnál viszont vannak eltérések. Meglepően alacsony a legtöbb

fémet tartalmazó minta elnyelése 290 nm felett. A 0,30–0,80 μmol fémet tartalmazó minták elnyelése nagyon hasonló 300 nm alatt, felette a 0,40–0,80 μmol fémtartalmú minták spektrumai hasonlóak. 240 nm alatt részben megfordul a tendencia, itt a 2,40 μmol (legtöbb) fémet tartalmazó minta elnyelése magas, és alacsony az abszorbanca 1,20 és 0,24–0,30 μmol -nál. Az utóbbiaknál ez az exponenciális alapvonalnak köszönhető, viszont nagyon jól strukturált a görbe. Szépen kivehető a két elnyelési maximum 280–290 nm-nél, illetve a váll is 227 nm körül (ábrán nem látható). A 2,40 μmol mintánál a 290 nm-es elnyelés már csak vállként látható, és a többi jellegzetes elem is gyenge.



40. ábra: A) Az $n_{\text{fémion}}$ optimalizálásához használt minták abszorbanca spektrumai (100x hígítás) B) A Tf-Au/Ag NCs 3D fluoreszcencia spektruma ($n_{\text{fémion}} = 0,40 \mu\text{mol}$, $n_{\text{Au}}:n_{\text{Ag}} = 8,5:1$, $c_{\text{Tf}} = 0,57 \text{ mg oldva } \{1,1 \text{ ml mintában}\}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)¹⁴¹

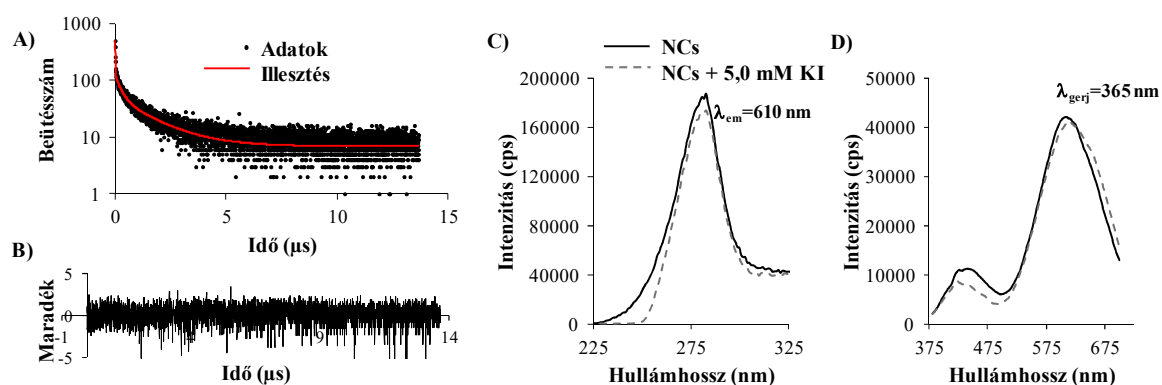
A Tf-Au/Ag NCs teljes fluoreszcencia spektrumát adó egyedi lumineszcens folyamatok felderítése érdekében 3D spektrumokat rögzítettünk a $\lambda_{\text{gerj}} = 200\text{--}500 \text{ nm}$ és $\lambda_{\text{em}} = 210\text{--}800 \text{ nm}$ tartományon (40. B) ábra). Már előzetesen ismert volt, hogy a NCs két jelentős emissziós sávval rendelkeznek, ezekből egy a kék ($\sim 440 \text{ nm}$), egy pedig a vörös tartományban ($\sim 600 \text{ nm}$) található $\lambda_{\text{gerj}} = 365 \text{ nm}$ mellett. A 3D spektrumok segítségével felderíthető, hogy vannak-e további csúcsok elrejtve, illetve hogy hány emissziós folyamat alkothatja ténylegesen a NCs spektrumát. Jól látható, hogy az első csúcs valójában legalább kettő, egymástól jelentősen eltérő csúcs összege. Ezek közül az egyik $\lambda_{\text{gerj}} = 280 \text{ nm}$ és $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$, míg a másik $\lambda_{\text{gerj}} = 325$ és $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ maximumokkal rendelkezik. Az első csúcs egyértelműen a fehérjében lévő Trp-hoz (annak indolgyűrűjéhez) köthető¹¹², a második ennél sokkal alacsonyabb intenzitású, így ez csak egy vállként jelenik meg a gerjesztési spektrumon, viszont sokkal látványosabb az emissziós spektrumokon. A vörös

tartományban lévő csúcs alakja nem változik sokat a gerjesztési hullámhossz változtatásával, viszont maximuma 600 nm-ről 590 nm-re tolódik, ami a Kasha-törvény ismeretében ¹¹² arra enged következtetni, hogy min. két folyamat okozza az emissziót ebben a tartományban is.

A Tf-Au/Ag NCs emissziós spektrumát összevetettük egy azonos fehérje-koncentrációjú mintával is, mindkettő esetében a fehérje emissziós maximumához tartozó gerjesztési hullámhosszt alkalmazva ($\lambda_{\text{gerj}} = 280 \text{ nm}$). A NCs képződése jelentősen, 34 %-kal csökkentette az emissziós intenzitást, emellett az alacsonyabb energia irányába jelentősen el is tolta azt (330 nm-ről 350 nm-re). Ez a jelenség többféleképp is magyarázható. Ismeretes, hogy a Trp-ban található indolgyűrű emissziós csúcsa vöröseltolódást szenved, ha a fehérje kitekeredik ¹¹², ez pedig a korábbi méréseink alapján jellemző a NCs képződésekor (*később a Tf-Au/Ag NCs-re is bizonyítjuk*). A fématomok jelenléte ekkor megváltoztatja a fehérje másodlagos szerkezetét, ami a Trp oldalláncok helyzetét, így hozzáférhetőségét is megváltoztathatja kioltó molekulák (pl. az oldószermolekulák) számára, ami többek között az emissziós maximum nagyobb hullámhosszok felé tolódásával és az intenzitás csökkenésével járhat ¹¹². A fémionok jelenléte kioltás révén hatással lehet ezen felül a Trp fluorofórok emissziójára is. A szintézis idejét vizsgáló mérésekből korábban már kiderült, hogy ezek a folyamatok a NC-képződés korai szakaszában (0–60 perc) már lejátszódnak.

Az egyes *lumineszcens folyamatok élettartamának* meghatározása alkalmas az adott hullámhosszokon mért jelek beazonosítására. Méréseink során mind a Tf-Au NCs, mind a Tf-Au/Ag NCs fluoreszcencia élettartamát mértük különböző beállítások mellett. Az egyes lecsengési görbéket három exponenciális komponens segítségével illesztettük meg (minimálisan ennyi komponens adott megfelelő illesztést). Az emissziós maximum (mérési körülmények mellett 640 és 580 nm, az utóbbi ponthoz tartozó mérési eredmények a **41. A)** és **B) ábrán** láthatók) esetén mért komponensek (τ_1 – τ_3) a következők: a legnagyobb hozzájárulást (75–80 %) a legnagyobb, μs -os komponens (τ_1) adta, értéke Au NCs-nél 2,20 μs , kétfémes NCs-nél 1,56 μs volt. A második komponens ($\tau_2 = 410$ és 250 ns) hozzájárulása 17–20 % körüli, míg a legkisebb, pár ns-os ($\tau_3 = 11,8$ és 8,2 ns) komponenseké csupán 2,4 és 4,9 %. Az egyes komponensek változását (mind élettartam, mind hozzájárulás tekintetében) különböző hullámhosszok esetén is követtük a Tf-Au/Ag NCs esetén. Az élettartam komponensek értékei minden esetben nőttek magasabb hullámhosszok esetén, ami nem meglepő, hiszen az alacsonyabb energiájú folyamatok végbemenetele általánosan több időt igényel ¹¹². Ezzel szemben a hozzájárulások változása

fényt derít arra, hogy a hozzájuk rendelhető folyamat milyen emissziós maximummal rendelkezik. A τ_1 esetén láthatjuk, hogy a hozzájárulása egyre magasabb nagyobb hullámhosszok esetén (82,6–95,3 %), tehát ez az érték fog tartozni a legnagyobb λ_{em} értékkel rendelkező csúcshoz. Ezzel szemben a τ_2 és τ_3 értéke is csökken, az előbbi 11,1 %-ról 4,1 %-ra, az utóbbi 6,3 %-ról 0,6 %-ra. További adatok hiányában annyit tudunk megállapítani, hogy az első két komponens a NC-emissziókhoz, míg a harmadik a fehérjéhez köthető folyamatokhoz tartozhat. Emellett az is megállapítható, hogy τ_2 és τ_3 emissziós maximuma mindenképp 660 nm alatti (tekintve a vizsgált hullámhosszokon meghatározott folyamatos csökkenést) Ha az élettartammérésekhez rögzített emissziós spektrumon dekonvolúciót (csúcsfelbontást) hajtunk végre, azt láthatjuk, hogy a görbe vizsgált szakasza (500–750 nm) legalább három egyedi csúcsra bontható fel. Az első, legnagyobb energiájú csúcs maximuma 444 nm körül található, viszont mivel ezt extrapolációval határoztuk meg, így λ_{em} értéke ettől jelentősen is eltérhet. Ennek a csúcsnak a Trp emisszióhoz lehet köze, tekintve a pozícióját, élettartamát ($\tau_3 < 10$ ns) és legalacsonyabb hozzájárulását a vizsgált λ -értékeken.



41. ábra: A) Az élettartammérés során nyert adatpontok és a háromparaméteres illesztés görbéje (Tf-Au/Ag NCs, $\lambda_{gerj} = 371$ nm, $\lambda_{em} = 580$ nm, $rés = 6$ nm, frekvencia: 50 kHz) B) az illesztéshez tartozó reziduális (maradék) görbe C) a Γ -ionok jelenlétének hatása a Tf-Au/Ag NCs gerjesztési szinképére D) a Γ -ionok hatása az emissziós görbére ¹⁴¹

A következő csúcs maximuma 583 nm-nél található, így hozzájárulása a 610–710 nm tartományon szintén monoton csökkenést mutat, abszolútértéke viszont nagyobb, mint a τ_3 komponensé. Ezek alapján a τ_2 rendelhető ehhez a csúcshoz, ami fém-ligandum átmenethez tartozhat a NC-magoknál¹⁴². Az utolsó csúcs λ_{em} értéke 668 nm, ez egyértelműen τ_1 -hez köthető, ami a $S \rightarrow Au(I)$ LMCT/LMMCT típusú átmenet lehet, ami jellemző a fehérjével stabilizált nemesfém NCs-re. További említést érdemel, hogy a NC-magok összetétele

erősen változó lehet, így minden NC-hez rendelhető csúcs esetén elképzelhető, hogy azok valójában több, egymástól nem elkülöníthető folyamat összegeként jönnek létre. Mindezen megfontolások figyelembevételével azt mondhatjuk, hogy a NCs emisszióját ténylegesen két folyamat alkotja, a harmadik a fehérjétől származó folyamat. A fehérje fluoreszcens folyamatait a Tf-Au/Ag NCs-nél egy ismételt, a korábbi NCs-hez hasonló teljes emissziós tartományra kiterjedő vizsgálat segítségével állapítottuk meg. A NCs csúcsa többféle eredményt ad, két paraméterrel egy 280–810 ns és egy 1,7–4,9 μ s közötti tagot kapunk. Három tagnál (**F7. táblázat**) kétféle felbontást kaptunk: az egyiknél 5–7 μ s, 0,9–1,9 μ s és 37–191 ns, míg a másiknál 0,66–1,39 μ s, 65–316 ns és 2–4 ns. Az értékek alapján egy igen magas tag jelenik meg nagy hozzájárulással (43–60 %) 620 nm felett, amit nehéz mérni ez a hullámhossz alatt, így az nem is kerül be a kiértékelés során. A másik μ s-os tag a korábban is kimérttel megegyezik, és a többi is párosítható a korábbi eredményekkel. A fehérje csúcsa itt is 3 vagy 4 paramétert jósol (**F8. táblázat**), az értékek nagyon hasonlóak a többi fehérjéhez, azaz itt is a Trp adja az emissziós tagokat ($\tau_1 = 0,27\text{--}0,31$ ns, 13–17 %, $\tau_2 = 1,11\text{--}1,29$ ns, 27–29 %, $\tau_3 = 3,47\text{--}4,05$ ns, 40–43 %), a negyedik tag itt is ismeretlen ($\tau_4 = 9,43\text{--}12,21$ ns, 14–17 %).

A QY értékét szintén mindkét (egyfémű és Au/Ag) NC-nél meghatároztuk. A mérések alapján az Au NCs-re $4,21 \pm 0,15$ %, míg az Au/Ag NCs-re $3,46 \pm 0,30$ % adódott. Összevetve más fehérjével stabilizált NCs-ek elmondható, hogy a Tf-nel stabilizált NCs-ek átlagos kvantumhatásfokot mutatnak (2,5 % BSA, 2,31 % γ G és 4,8 % LYZ esetén ^{119,131}). Más, az irodalomban fellelhető Tf-tartalmú NCs-hez képest közel azonos (4,3 % ⁷⁶) vagy jóval alacsonyabb az érték (10,44 % és 9,16 % ²⁸). Ebben nagy szerepe lehet az előállítási folyamatnak, mivel a szakirodalmi anyagok esetében azokat mikrohullámú technikával ²⁸, illetve hozzáadott redukálószer (nátrium-borohidrid vagy aszkorbinsav ⁷⁶) segítségével állították elő, míg a mi esetünkben nem használtunk semmilyen segítő módszert/vegyszert. Fontos eltérés még, hogy a szakirodalmi méréseknél referenciaként rodamin-6G festéket használtak ⁷⁶, míg a mi méréseinknél kalibrált fényforrást használtunk, ezért az eredmények érdemben nem összehasonlíthatók. Az ilyen módon szintetizált anyag ettől függetlenül teljesen megfelelt a gyakorlati elvárásoknak, még tízszeres hígítást követően is megbízható nagyságú fluoreszcencia intenzitást adott a mérések kivitelezéséhez.

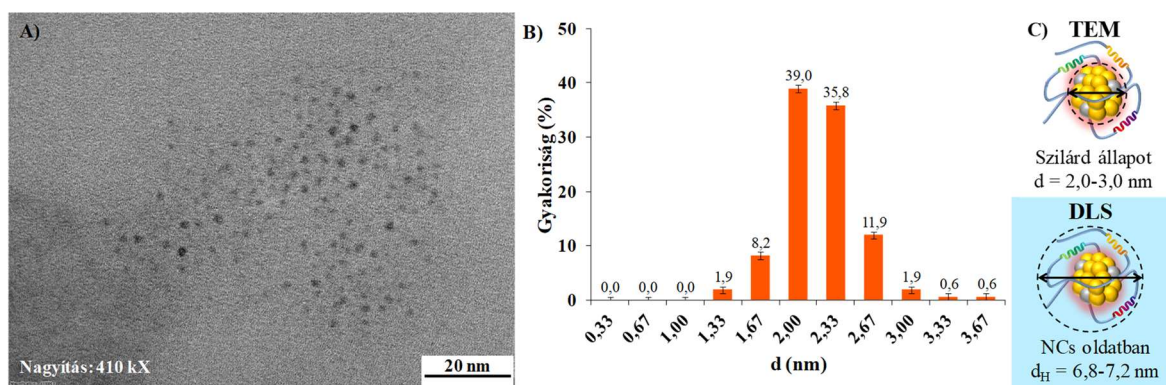
A fehérjeszerkezet alaposabb megismerése érdekében *jodidionos* (Γ -ion) *kioltási kísérleteket* végeztünk el (**41. C**) és **D**) ábra). Közismert tény, hogy a Γ -ion hatékonyan képes kioltani a Trp fluoreszcenciáját, és eredményesen alkalmazható fehérjék esetén is, ahol

csak a Γ^- -ion által hozzáférhető oldalláncok emisszióját képes kioltani ¹¹². Ennek ismeretében PBS közegben különböző KI koncentrációk mellett (1–5 mM) vizsgáltuk a Tf és a Tf-Au/Ag NCs kölcsönhatását Γ^- -ionokkal. A szabad fehérje esetén a Γ^- -ionok csökkentik a Tf emissziós intenzitását. Ha megvizsgáljuk a gerjesztési spektrumokat, akkor látható, hogy főleg a 240–260 nm régióban történtek apróbb változások. A kétfémes NCs-nél a Γ^- -ionok jelenléte csökkentette a kék tartományban az intenzitást, emellett jelentős kékeltolódást is okozott. Az emisszió tartományában látható némi fluoreszcencia-erősödés, ami leginkább a 670 nm környékén lévő részt érinti. Ha megvizsgáljuk a gerjesztési spektrumokat, akkor azt látjuk, hogy a Γ^- -ionok jelenlétében az alacsonyabb hullámhosszoknál (240–260 nm) volt csökkenés, hasonlóan a Tf-nél tapasztaltakkal. Ezzel párhuzamosan viszont a 300 nm feletti gerjesztési spektrum erősödik. Ezek az eredmények alapján a 3D spektrumoktól független módon képesek vagyunk az egyes gerjesztési és emissziós csúcsokat egymáshoz rendelni. A Γ^- -ionok által kiváltott kioltás azt jelenti, hogy a 450 nm-nél emittáló fluorofórok hozzáférhetők a Γ^- -ionok számára, azaz közelebb helyezkednek el a NCs felszínéhez. Ezek a csoportok kapcsolatba kerülnek az oldószermolekulákkal is, ami lecsökkenti az emissziós intenzitásukat, és azt az alacsonyabb energiák (magasabb hullámhosszok) felé tolják el, amit a fluorofór-oldószer közötti kölcsönhatások magyaráznak. A részecskében mélyebben elhelyezkedő fluorofórok ezzel szemben nem érhetők el sem az oldószer, sem a kioltó anyagok számára. Emellett a NC-csúcsot megvizsgálva azt láttuk, hogy a ligandum-fém átmenethez tartozó csúcs erősödik inkább a Γ^- -ionok jelenlétében, ami nagyobb kitettségük miatt nem meglepő, mivel a fémmagok mélyebben találhatók a fehérjén belül.

A szerkezet lumineszcens folyamatokon keresztüli jellemzése után áttértünk a fémtartalom és a NC-magok jellemzésére. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a tisztított kétfémes NCs tényleges arany- és ezüsttartalmát, *ICP-MS méréseket* végeztünk. A legtöbb szakirodalomban található NC esetén ez az információ nem elérhető ^{28,76}, így a termékek pontos összetétele nem áll rendelkezésre, csak az elméleti számításokra hagyatkozhatunk a közölt eredmények értékelésekor. A mi esetünkben azt tapasztaltuk, hogy az elméleti és valós fémkoncentrációk jelentősen eltérnek. Az Au esetén a mintában lévő mennyiség 25,2 %-kal csökkent, ami annak tudható be, hogy az el nem reagált Au-vegyületek a dialízis során távoztak a mintából. Ezzel szemben az Ag esetén magasabb koncentráció lett megállapítva, ami mintakészítési hibának tudható be (a tisztítás során a koncentráció emelkedése kizárható, esetleg az oldószer párolgása miatt történhet emelkedés).

Feltételezve, hogy az Ag-tartalom lényegében változatlan maradt, az Au-Ag arány a kiindulási 8,52:1-ről 5,65:1-re változott, ami 85 %-15 % végső elemösszetételnek felel meg.

Az $n_{Au}:n_{Ag}$ arány és oxidációs állapota mellett fontos ismerni a kialakuló NCs tényleges méretét is. Habár XPS méréseket nem végeztünk az oxidációs állapotok meghatározására, az Au oxidációs állapota nagy valószínűséggel hasonló a többi előállított NC-hez, azaz a NCs-et döntően Au(0) és kevés Au(I) alkothatja. A TEM képek bizonyítják a NCs képződését, ezek alapján a NC-magok átmérője $2,0 \pm 0,3$ nm szűk méreteloszlás mellett (**42. A** és **B** ábra). A NCs gömb alakúak, méretük lehet valamivel nagyobb, hiszen nagyon kis átmérőjük miatt olvadáspontjuk alacsony, ezért a nagy energiájú elektronnyaláb mintára fókuszálásakor könnyen megolvadnak. A DLS mérésekből származó d_H értékkel ($7,2 \pm 0,6$ nm) összehasonlítva jóval kisebb értéket kaptunk, ami nem meglepő, mivel a fényszórásmérés nem a részecskék valódi fizikai méretére, hanem azok hidrodinamikai átmérőjére érzékeny, ami tartalmazza a részecskét kísérő stabilizáló réteget is, amiben ellenionok is találhatók (szemléltetése a **42. C** ábrán látható). Fontos különbség még, hogy a fehérjemolekula vizes közegben más méretű, mint szilárd (felcseppentett) állapotban, így ez is hozzájárul a tapasztalt méretkülönbséghez.

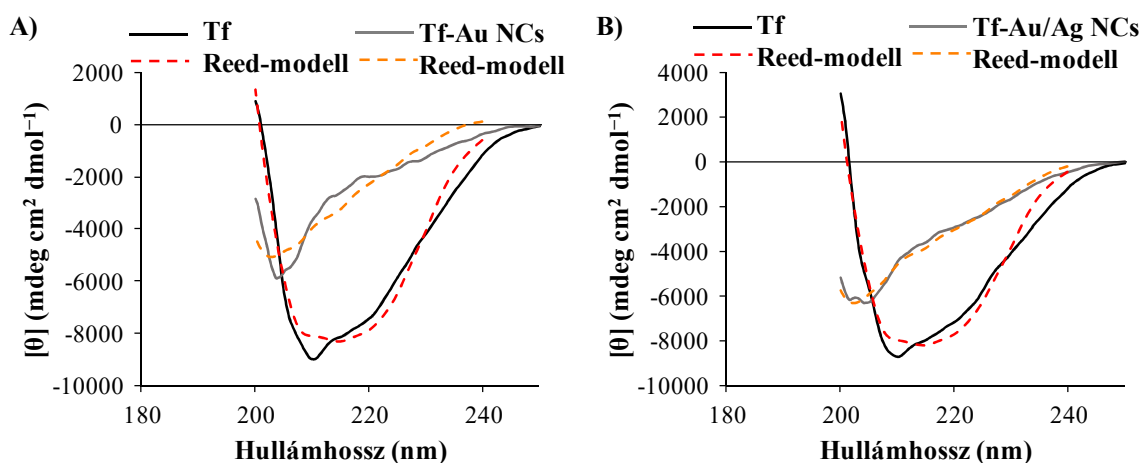


42. ábra: A) A Tf-Au/Ag NCs reprezentatív TEM felvétele B) és a kép alapján készített méreteloszlás C) a TEM és DLS mérések által szolgáltatott méretek szemléltetése ¹⁴¹

A NC-képződés másodlagos fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását elsőként itt is FT-IR mérésekkel ellenőriztük. Az eredmények alapján kevés nagy eltérés látható a tiszta fehérje és a NCs spektrumán, de döntően ugyanazok a csúcsok jelennek meg kis eltérésekkel. Jelentősen az Au NCs spektruma különbözik, itt viszont egy mintaelőkészítési hiba (minta felolvadása a liofilizálás befejezése előtt) jelentősen megváltoztatta a fehérje állapotát. Az Au NCs spektrumán egy széles sáv található $2500\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ között, ami S-H kötéshez lehet rendelni ¹⁴³. Néhány másik csúcs is mutat abszorbancia növekményt (pl. 1395 és

835 cm^{-1}), ezeket nem rendeltük kémiai kötésekhez, mivel az ujjlenyomat-tartományban jelentek meg. A legszembetűnőbb változás az amid I. csúcsnál van 1640 cm^{-1} értéknél, itt arányaiban nagy emelkedés látható az amid II. csúcsához képest, ami 1570 cm^{-1} körül jelentkezik. A csúcs a nagyobb hullámszámok felé tolódik el a NC-képződés hatására (Tf: 1634 cm^{-1} , Au NCs: 1641 cm^{-1} , Au/Ag NCs: 1643 cm^{-1}), ami hasonlít a szakirodalomban található eredményekre ¹⁴⁴, bár ott a csúcs sokkal magasabban, 1656–1664 cm^{-1} értéknél jelentkezik. Az amid I. csúcs felbontásával becslést tehetünk a másodlagos szerkezeti elemek arányára a fehérjemolekulában, hiszen az egyes elemek eltérő hullámszámokon mutatnak elnyelést. A görbe alatti területek összevetésével azt láthatjuk, hogy a NC-képződés hatására jelentősen lecsökken a Tf α -hélix, emellett β -redő tartalma, míg a β -kanyar és rendezetlen szerkezet aránya megnő. Ezt a változást az okozza, hogy a fématomok és fehérje közötti kölcsönhatás alapvetően deformálja a szerkezetet, ráadásul a fém redukciója, és a NCs képződése tovább változtatja ezt a szerkezetet. További hatással bír a pH jelentős megnövelése, az Au és Ag atomok komplexképzése a kén és nitrogén atomokkal, illetve a Tyr csoportok oxidációja is. Mivel az egyfémű NCs-nél is hasonló eredményeket láthattunk, így kijelenthetjük, hogy a fémmagok összetételének ekkora (~10-15 %-os) változtatása nem befolyásolja érdemben a NC-képződés folyamatát, így a protein szerkezetét sem.

Az FT-IR mérések mellett CD spektrumok felvételével is igazolni kívántuk a Tf szerkezetváltozását a kétféle NC-rendszerben. (43. ábra).



43. ábra: A Tf CD jelének változása a NC-képződés hatására A) az egyfémű Au NCs-nél és B) a kétfémű Tf-Au/Ag NCs esetében ¹⁴¹

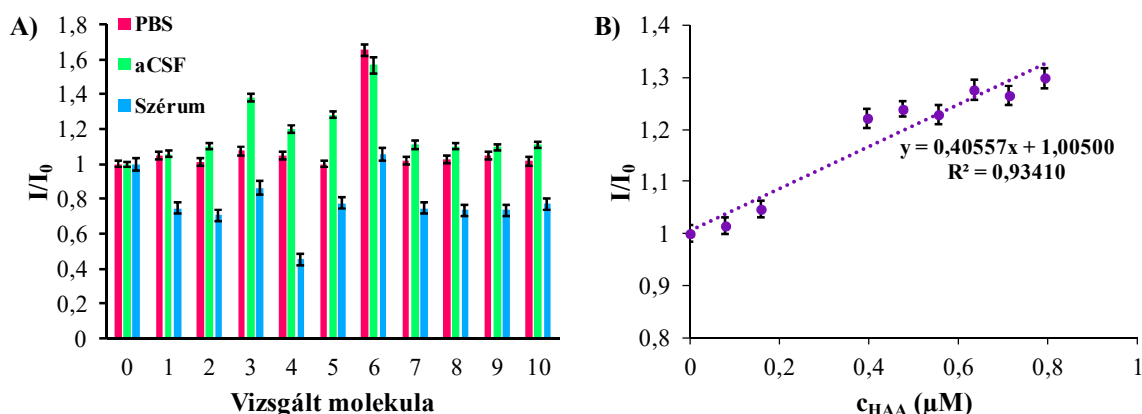
Vizsgáltuk azonos fehérjekoncentrációjú Tf-oldat, Tf-Au NC és Tf-Au/Ag NC-diszperziók spektrumait is, 0,059 és 0,065 mg/ml értékek mellett. Az eredmények Reed-modellel történő illesztése hasonló eredményekre vezetett, mint az FT-IR mérések. A minták α -hélix tartalma jelentősen lecsökkent (11,9–12,3 %-ról 0-0,4 %-ra), emellett β -redő tartalma is csökkent (44,8–46,4 %-ról 38,3–41,3 %-ra). A β -kanyar és rendezetlen szerkezet aránya ezzel szemben megnőtt (az előbbinél 4,5–6,7 %-ról 5,1–9,7 %-ra, az utóbbinál 36,2–37,3 %-ról 52–53,2 %-ra). Jelentős eltérés látható az utóbbi két szerkezeti elem arányában az FT-IR és CD eredményeknél. Ez azzal magyarázható, hogy az előbbi módszernél szilárd pormintákat vizsgáltunk, míg az utóbbinál oldatokat. Fontos figyelembe venni azt is, hogy az alkalmazott illesztési eljárások egyik mérés esetében sem adnak megfelelő illeszkedést a mért és az illesztett görbék között, így a százalékos értékek esetén helyesebb azok változását, mint abszolútértékét értelmezni. További észrevétel, hogy az Au NCs és Au/Ag NCs másodlagos szerkezeti elemeinek aránya eléggé hasonló, alátámasztva az FT-IR eredményeket.

5.5.3. Szenzorikai vizsgálatok

Az analitikai érzékelés céljából előnyös, ha a jelzőanyag kinetikailag és optikailag is stabil, nem aggregál sem az analit, sem a mátrix egyes összetevőinek jelenlétében. A gyakorlati alkalmazás szempontjából elengedhetetlen volt megvizsgálni, hogy a Tf-Au/Ag NCs milyen stabilitással bírnak különböző körülmények mellett (ionerősség és pH). Ennek ellenőrzése érdekében először különböző NaCl koncentrációjú (0-0,5 M) oldatokban vizsgáltuk a kétfémes NCs sötétítését. Az eredmények azt mutatták, hogy egyik esetben sem történt makroszkópikus aggregáció, viszont az emissziós intenzitás jelentősen (23-24 %-kal) emelkedett 0,05 M-ig, majd lassan csökkent 0,5 M-ig (–10 %). A következő lépésben a minta pH-tűrését elemeztük az 1–13 tartományban. A fluoreszcencia értéke nem változott jelentősen, egyedül pH = 1 és 2, valamint az i.e.p. környékén. Az utóbbinál a fehérje közel semleges töltése destabilizálja a NCs-et, ezáltal aggregáltatva azokat. Ez megnöveli a fluoreszcenciát az AIE jelenségén keresztül (+45–47 %), de a nagyfokú közegbeli destabilizáció ezt az előnyt erősen túlsúlyozza. Alacsony pH esetén jelentősen megváltozik a fehérje szerkezete (hiszen áttöltődés történt), illetve az Ag atomok kioldódhatnak a NCs-ből, ezek a hatások jelentősen lecsökkentik a minták emissziós intenzitását (–12–46 %), és azt a vörös tartomány felé tolják el (613→650 nm). Ezek alapján azt állapítottuk meg, hogy a NCs biztonságos felhasználásához pH > 6 érték szükséges, és viszonylag magas (0,1 M) ionerősségek mellett is eredményesen lehet használni őket. Ezt a megállapítást a

szakirodalom is alátámasztja, a megjelölt cikkben ⁷⁶ semleges és lúgos közeget javasolnak a munkához. A *kinurenin útvonal* molekuláinak érzékelésére szolgáló kísérletek során tíz különböző molekulát vizsgáltunk meg, melyek szerkezeti képlete a **14. ábrán** látható. Az útvonal molekulái és a NCs között lehetségesen kialakuló kölcsönhatások vizsgálata során két különböző biológiai folyadékot modellező közeget (PBS-t és aCSF-ot), illetve egy módosított, valós biológiai közeget használtunk, ez utóbbi PBS közeggel ötszörösére hígított emberi vérérumot jelentett. A kimutatási kísérleteket a *4.3.3 Szenzorikai vizsgálatok* fejezetben leírt koncentrációk mellett először az egyféműes Tf-Au NCs-vel végeztük el ($c_{Tf} = 6,52 \times 10^{-2}$ mg/ml), de itt csak nagyon kis válaszjeleket kaptunk ($I/I_0 = 1,1-1,2$), lényegi változások nem voltak megfigyelhetők.

A Tf-Au/Ag NCs esetén ($c_{Tf} = 0,117$ mg/ml) a *PBS közegben* azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált molekulák közül ($c = 34,35-34,55$ μ M a beméréstől függően) csak a 3-HAA esetén (6. molekula) jelentkezik látványos fluoreszcencia-erősödés, melyet a **44. A) ábrán** jól szemléltetnek a piros oszlopok.



44. ábra: A) A kinurenin útvonal molekuláinak jelenlétében a NCs I/I_0 értékeinek változása PBS, aCSF és hígított vérérum közegekben (I : molekula jelenlétében mért intenzitás, I_0 : a NCs intenzitása a molekulák távollétében azonos koncentrációk mellett ($n_{fémion} = 0,022$ μ mol, $c_{fémion} = 8,70$ μ M, $c_{molekula} = 34,35-34,55$ μ M) B) és a LOD meghatározására szolgáló kalibrációs egyenes aCSF közegben ¹⁴¹

Ez a jelenség eltér a szokásos, fluoreszcencia-kioltáson alapuló analitikai tesztanyagoktól ^{30,46,108,117,119}, viszont egyezést mutat korábbi, egyféműes NCs-et felhasználó munkákkal ²⁸. A többi molekula esetén apróbb eltéréseket láttunk, ami legtöbbször a saját kék emissziójából származó hatás volt, ami a maximum hullámhosszt is eltolta pár nm-rel. Az egyedüli kivétel a HKyn (5.) volt, ahol megváltozott az emissziós görbe alakja, főleg a NC-emisszió kisebb energiájú oldalán volt látható erősödés (LMCT/LMMCT, amihez a τ_1

élettartam rendelhető). A 3-HAA (6.) esetén további méréseket is végeztünk, hogy meghatározzuk a kimutatási határ (LOD) értékét. Ehhez vizsgáltuk a 0–34,4 μM tartományban a válaszjelet, és végül $\text{LOD} = 0,55 \mu\text{M}$ eredményt kaptunk PBS közegben. Ez az érték jelentősen alacsonyabb a kinurenin-kör más molekuláit (Kyn és Kyna) célzó NC-es módszerekhez képest (ott rendre 15–22 μM ⁴⁶ és 60–80 μM ¹¹⁹ értékek jellemzők). Magas 3-HAA koncentrációknál zavarhatja a mérést, hogy a 3-HAA saját fluoreszcenciával rendelkezik a kék tartományban, ami átfedhet a NCs emissziójával. Ez a jelenség nem meghatározó az érzékelési hullámhosszon, különösen az alacsonyabb koncentrációknál. A fluoreszcencia-erősödés magyarázható a korábban taglalt AIE jelenséggel. Jelen esetben ez nem a részecskék nagymértékű aggregációját jelenti, a 3-HAA magasabb koncentrációi esetén sem jelentkezett szemmel látható aggregáció vagy részecskeképződés. Az AIE itt inkább a részecskét stabilizáló fehérjeburok valamilyen mértékű ridegebbé válásából származhat, amit a fehérje és a 3-HAA között létrejövő kölcsönhatás magyarázhat. A merevebb fehérjeszerkezet csökkenti a sugárzásmentes legerjesztődési folyamatok valószínűségét, ezáltal megnöveli a fluoreszcens foton kibocsátásának esélyét, így növelve a minta fluoreszcencia intenzitását. A fluorimetria mellett élettartammérésekkel is vizsgálni kívántuk a 3-HAA és a NCs kölcsönhatását. Az eredményekből azt láttuk, hogy az átfedő emissziós csúcsok miatt jelentősen megnőtt a τ_3 komponens hozzájárulása. Ez a tag mindenképpen tartalmazza az eredeti, fehérjétől (pontosabban Trp-tól) származó értéket, plusz a 3-HAA saját emisszióját, így a hozzájárulás növekedése egyértelmű a koncentrációemelkedés miatt. A NC-emisszióhoz tartozó élettartamok hozzájárulása természetesen csökkent, emellett abszolútértékük is alacsonyabb lett. Ez lehet a 3-HAA jelenlétének következménye, de a mérési paraméterek is okozhatták az eltérést, így itt nem állíthatunk semmi biztosat.

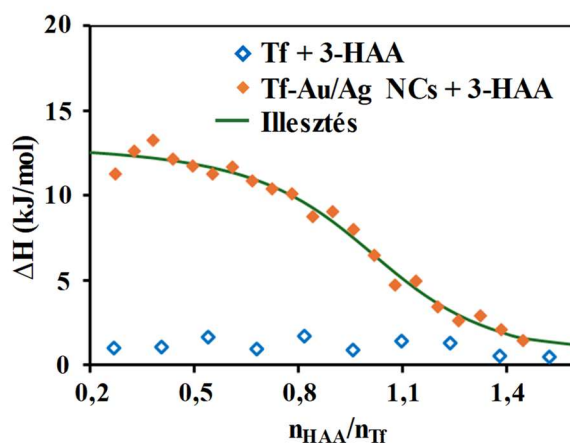
A szenzorikai méréseket elvégeztük *aCSF* közeg használata mellett is (**44. A) ábra**, zöld oszlopok). Itt valamennyivel másabb eredményeket kaptunk: elsőként is már maga az *aCSF* közeg is 10–15 %-kal megnövelte a NC-emisszió intenzitását, de ez a méréseket nem zavarta. A vizsgált molekulák tovább növelték ezt a jelet, függetlenül a szerkezetüktől. Szelektív emelkedést csak bizonyos molekuláknál tapasztaltunk. Ilyenek voltak a XA (3.), Kyn (4.), HKyn (5.) és 3-HAA (6.). A Kyn semmilyen erősítést nem mutatott PBS közegben, viszont *aCSF*-ben egy erős emissziós csúcs jelenik meg 480 nm körül, ami egy, a Kyn-ből és az *aCSF* valamelyik komponenséből képzett komplextől származhat. Ez az újonnan megjelent csúcs erősen átfed a NCs emissziójával, és jelentősen megemeli és eltolja azt a

630 nm alatti tartományon. Ez a hullámhossz felett a NC-emisszió alakja és intenzitása változatlan, ezért a szelektív erősítés kizárható. A 3-HAA esetén szintén elvégeztük a LOD meghatározását (**44. B) ábra**), és itt valamivel alacsonyabb, 0,32 μM értéket állapítottunk meg. A lineáris tartomány nagyon rövid, amit egy hosszú telítési rész követ, majd a telítés $\sim 5 \mu\text{M}$ felett következik be. Mivel a 3-HAA saját fluoreszcenciával rendelkezik 425 nm-nél, így koncentrációja függetlenül is megállapítható lenne, de az ezen a tartományon emittáló számos zavaró vegyület (köztük számos kinurenin-útvonalhoz tartozó molekula. pl. AA) is fluoreszkál, így jóval biztonságosabb meghatározást kínál a NCs-kel történő kimutatás.

Harmadik közegként a *hígított vérszérumot* vizsgáltuk meg (**44. A) ábra**, kék oszlopok). Ez a mátrix erősen szórja a fényt, emellett magas fehérjetartalma miatt a kék tartományban magas fluoreszcenciát mutat, megnehezítve ebben a tartományban az analitikai vizsgálatokat. A különbségi spektrumokat elemezve láttuk, hogy a közeg hatására jelentősen eltolódik a NCs saját emissziós spektruma (609 $\rightarrow$ 647 nm), viszont az analitok jelenlétében visszakerül a vizes közegben meghatározott tartományba (647 $\rightarrow$ 613 nm). A közeg jelentősen csökkenti az emissziós intenzitást, amit a XA és a 3-HAA képes visszanövelni, lehetővé téve a kvantitatív meghatározást ebben a közegben is, igazolva a NCs alkalmazhatóságát valós környezetben. Mivel a mennyiségi meghatározást nem végeztük el, erről annyi megállapítást tudtunk csak tenni, hogy a közeg saját fluoreszcenciája miatt annyira megnő az adatok szórása ($\sim 80\%$), hogy a LOD értéke bizonyosan magasabb lesz, mint PBS vagy aCSF közegekben.

A Tf-Au/Ag NCs reakcióját vizsgáltuk egy másik triptofán bomlási útvonal, a *szerootonin-kör* esetén is (csak PBS és aCSF közegekben). Ebben az esetben néhány molekula (5-hidroxi-*L*-triptofán {HTrp, 11}, HTA {12} és *N*-acetyl-szerotonin {ASer, 13}) mutatott erősítést, függetlenül az alkalmazott közegtől. Ez azt jelenti, hogy e molekulák esetén nem valósítható meg szelektív érzékelés. Összevetve azon molekulák szerkezetét, amik erősítették a NCs emisszióját, azt láthatjuk, hogy mindegyik tartalmaz egy fenolos OH csoportot. Habár a Kyna is tartalmaz egy ilyen csoportot egy aromás gyűrűn (4-hidroxikinolin), mégsem mutat erősítést, ami azzal magyarázható, hogy a gyűrűben lévő N-atom felerősíti a keto-enol tautóméria jelenségét, ezáltal az egyensúly erősen a keto-forma képződése felé van eltolva. Összefoglalva kijelenthetjük, hogy a fenolos OH csoport jelenléte fontos az érzékelési reakció sikeressége szempontjából, de szerepe tisztázatlan.

A 3-HAA és a Tf-Au/Ag NCs között létrejövő kölcsönhatás vizsgálatára *ITC méréseket* végeztünk el (**45. ábra**). A mérések eredményeit (dQ/dt) differenciális kalorimetriás görbéken ábrázoltuk az idő függvényében. Az ezekből képzett entalpogramokon az egyes adagolási lépésekhez tartozó hőeffektusokat (amit a Tf és a 3-HAA közötti kölcsönhatás idézett elő) láthatjuk a ligandum/fehérje mólarány függvényében, minden egyes adagolási lépésnél. Más, fluorimetrián alapuló hőmérsékletfüggő vizsgálatokat^{46,119} nem tudtunk elvégezni a mintán, hiszen nem kioltási reakció szolgáltatja az érzékelés alapját. Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy a szabad Tf és a 3-HAA között detektálható-e bármilyen kölcsönhatás, és ha igen, akkor milyen típusú reakció játszódhat le közöttük. A mérések során olyan koncentrációviszonyokat állítottunk be, melyek az analitikai tesztekkel megegyeznek, különösen az alacsony koncentrációjú régiókra fókuszálva.



45. ábra: A 3-HAA és a Tf, valamint a Tf-Au/Ag NCs reakciójának követése ITC mérésekkel, és az utóbbi illesztése egy kötőhelyet feltételező modellt alkalmazva¹⁴¹

Az eredmények alapján azt láttuk, hogy nem lépett fel semmilyen mérhető kölcsönhatás a két anyag között. Ezek után megvizsgáltuk, hogy mi történik a NCs jelenlétében ugyanazon fehérje- és ligandumkoncentrációk mellett. A NCs esetében már szelektív, jól kimérhető reakciót tapasztaltunk. A mérési adatokat egy kötőhelyet feltételező modellel megillesztve jó illeszkedést kaptunk, és ezzel meg tudtuk határozni a reakció termodinamikai paramétereit, amiket az **5. táblázatban** foglaltunk össze. Eredményeink alapján a moláris szabadentalpia $-36,15$ kJ/mol-nak adódott, ami termodinamikailag kedvezményezett reakciót jelent. A moláris entalpia értéke $13,1$ kJ/mol volt, míg a moláris entrópia 165 J/(mol·K), ezek alapján a reakció endoterm és entrópiavezérelt folyamat ($\Delta H < T\Delta S$).

Ezek alapján a fluoreszcencia megváltozását egy szerkezetváltozás okozhatja, amit a ligandum fehérje kötőhelyére történő beépülése vált ki.

5. táblázat: *A Tf-Au/Ag NCs és a 3-HAA között lezajló reakció termodinamikai paraméterei (egy kötőhelyes modell) ¹⁴¹*

Tf-Au/Ag NCs + 3-HAA	ΔG_1 (kJ·mol ⁻¹)	ΔH_1 (kJ·mol ⁻¹)	ΔS_1 (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	K_{a1} (M ⁻¹)	N_1
Érték	-36,15	13,12	165	2,17·10 ⁶	1,03
Szórás	0,38	0,33	0	0,33·10 ⁶	0,01

A FT-IR és CD-mérések már bizonyították a NC-képződés másodlagos szerkezetre gyakorolt hatását, ami arra enged következtetni, hogy a fehérje felszínén (az oldattal érintkező régióban) új aminosavak jelenhetnek meg, amik lehetséges kötőhelyet formálhatnak a 3-HAA számára, és ez a kötőhely nem volt jelen a szabad Tf szerkezetében.

5.5.4. Biológiai aktivitást mérő vizsgálatok

Dr. Spengler Gabriella irányításával (SZTE Orvosi Mikrobiológia Intézet) tanulmányoztuk az egyes NCs biológiai aktivitását, citotoxicitását és antibakteriális hatását. A meghatározott értékeket – a *Függelékben* leírt vizsgálatok elvégzése alapján – a **6. és 7. táblázat** foglalja össze. Az említett táblázatok nemcsak az 5.5. fejezetben tárgyalt egy- és kétfémes Tf-nel stabilizált NCs biológiai vizsgálat eredményeit foglalják össze, hanem a BSA, LYZ és a γ G fehérjék felhasználásával előállított egy- és kétfémes NCs megfelelő eredményeit is.

6. táblázat: *A citotoxicitás meghatározása MTT-esszével (optikai denzitás, OD mérésével)*

Citotoxicitás		
Sejtvonal	<i>Colo205</i>	<i>CCD-19Lu</i>
Minta	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
DOX (referencia)	0,71 ± 0,01	-
BSA-Au NCs	> 50	> 50
BSA-Au/Ag NCs	> 50	> 50
LYZ-Au NCs	> 50	> 50
γG-Au NCs	> 50	> 50
γG-Au/Ag NCs	> 50	> 50
Tf-Au NCs	> 50	> 50
Tf-Au/Ag NCs	> 50	> 50

7. táblázat: A vizsgált NCs antibakteriális hatásának vizsgálata a minimális inhibíciós koncentráció (MIC) meghatározásával

MIC meghatározás				
Vizsgált baktériumtörzs	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> meticillin-rezisztens ATCC 43300	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603
Minta	Érték (μM)	Érték (μM)	Érték (μM)	Érték (μM)
BSA-Au NCs	> 50	> 50	> 50	> 50
BSA-Au/Ag NCs	> 50	> 50	> 50	> 50
LYZ-Au NCs	> 50	> 50	> 50	> 50
γG-Au NCs	> 50	> 50	> 50	> 50
γG-Au/Ag NCs	> 50	> 50	> 50	> 50
Tf-Au NCs	> 50	> 50	> 50	> 50
Tf-Au/Ag NCs	> 50	> 50	> 50	> 50

A mérésekhez kifejezetten magas koncentrációkat (> 50 μM) is alkalmaztak, biztosítva a hatásuk értékelését a valós alkalmazási koncentrációknál töményebb rendszerek esetén is. Az eredmények megmutatták, hogy sem a vizsgált egyfémű, sem a kétfémű Au/Ag NCs nem mutatnak antiabakteriális vagy citotoxikus hatást, tehát alkalmazásuk e mérések alapján nem ütközik kompatibilitási problémákba. Természetesen ezek reprezentatív mérések, így a potenciális orvosbiológiai felhasználásukhoz további, biokompatibilitást célzó mérések¹²⁸ elvégzése is szükséges, ami időhiány miatt már nem képezte jelen doktori munka anyagát.

6. Összefoglalás

A nemesfém nanoklaszterek (NCs) egyfajta határterületet képeznek a molekulák és a klasszikus nemesfém nanorészecskék (NPs) között, mivel egyedi optikai sajátságokkal rendelkeznek, mint a fotolumineszcencia (fluoreszcencia vagy foszforeszcencia). További különlegességük, hogyha kétféle fémből építjük fel a NCs-et, akkor a termék szerkezeti, optikai vagy katalitikus tulajdonságai különbözni fognak az egyfémű NCs egyedi sajátságaitól. Orvosbiológiai területen történő alkalmazásukhoz elengedhetetlen biokompatibilis jellegük biztosítása. Ezt legtöbbször a stabilizáló molekulák helyes megválasztásával érhetjük el, amelyek lehetnek például aminosavak vagy fehérjék. Doktori munkám megkezdésekor a kutatócsoportunkban csak egyetlen közlemény született kétfémű NCs-ről, ezért célul tűztük ki új, fehérjével stabilizált kétfémű (Au/Ag) NCs előállításának fejlesztését. Kiemelt célunk volt a NCs fluoreszcencia intenzitásának növelése, amit az előállítási paraméterek szisztematikus változtatásával igyekeztünk szabályozni. A tisztított és részletesen jellemzett kétfémű rendszereket (az egyfémű NCs mellett) különböző alkalmazási területeken kíséreltük meg felhasználni. Vizsgáltuk potenciális fluoreszcens jelölőanyagként betöltött szerepüket kolloidális hatóanyag-hordozó részecskék esetén, ill. tanulmányoztuk őket analitikai jelzőanyagokként a triptofán metabolitok szelektív azonosítása céljából.

A doktori munka során elsőként bemutattuk, hogy a vizes közegű „templátos” eljárással, a reakciókörülmények szisztematikus változtatásával megnövelt (a fémtartalomra vonatkozóan 5–7-szer nagyobb) fluoreszcencia intenzitású Au/Ag kétfémű NCs állíthatók elő szobahőmérsékleten a BSA és LYZ fehérjék felhasználásával. Az arany 3–10 m/m%-ának ezüstre történő cseréje által a BSA-Au NCs fluoreszcencia maximuma $\lambda_{em} = 660$ nm-ről 620 nm-re hangolható (BSA-Au/Ag NCs), míg az antibakteriális hatású LYZ felhasználásakor $\lambda_{em} = 570$ és 600 nm fluoreszcencia maximummal rendelkező kétfémű NCs (LYZ-Au/Ag NCs) szintetizálhatók. A szakirodalomban elsőként mutattuk be a LYZ alkalmazását kétféle (sárga és narancs) fluoreszcens Au/Ag NCs „templátos” eljárással történő előállítására.

Az előállított és tisztított kétfémű NCs optikai és szerkezeti sajátságainak értelmezése során igazoltuk, hogy valamennyi termék μ s-os átlagos élettartammal rendelkezik (három komponens illesztése alapján), és az ezüst beépülése révén kialakuló szinergisztikus hatás miatt a belső kvantumhatásfok a tiszta Au NCs-re jellemző 1,5 %-ról akár 7,5 %-ra

növelhető. Az XPS mérések egyértelműen rámutattak az arany fémes karakterére, míg a CD és FT-IR mérésekkel együttesen bizonyítottuk a NC-képződés hatását a stabilizáló fehérjék másodlagos szerkezetére. A BSA-Au/Ag NCs-re vonatkozóan antibakteriális aktivitás és citotoxicitás próbákkal igazoltuk, hogy azok nem rendelkeznek biológiai aktivitással ($IC_{50} > 50 \mu M$).

A fluoreszcens egy- és kétfémes NCs-et elsőként alkalmaztuk kitozán-hialuronsav hatóanyag-hordozó részecskék jelölésére. Megállapítottuk, hogy a megfelelő stabilitást biztosító fehérje anyagi minősége nem meghatározó, hiszen mindkét egyfémes NC kitozán/hialuronsav alkotta részecskékkel való kölcsönhatása során elég alacsony $m_{NC}:m_{kolloid}$ aránynál ($< 0,15$) már aggregáció figyelhető meg. A kétfémes NCs-ekkel lényegesen stabilabb „komplex” részecskék jelenléte detektálható egészen $m_{NC}:m_{kolloid} \sim 1,5$ arányig, amit a kétfémes rendszerben jelenlévő nagyobb mennyiségű stabilizáló fehérje jelenléte biztosíthat. Rámutattunk arra is, hogy a BSA-nal stabilizált NCs felhasználásakor azonosíthatunk nagyobb mértékű aggregációt azonos tömegarány beállítás mellett. A LYZ-Au NCs-nél lényeges (2,8-szeres) fluoreszcencia erősítést is megfigyelhetünk a hordozó részecskék jelenlétében, ami az AIE jelenségének tulajdonítható. A hordozó részecskék típusát összevetve kijelenthetjük, hogy a mag-héj szerkezetű részecskék felületi rétegében jelenlévő nagyobb mennyiségű negatív töltésű hialuronsav jobban hozzáférhető volt a LYZ-mal stabilizált NCs-ek. A poliszacharid molekulák képesek voltak valamilyen módon gátolni a NCs-et stabilizáló LYZ molekulák szabad mozgását, ezzel csökkentve az emisszió nélküli legerjesztődés valószínűségét és így erősítve a NCs fluoreszcenciáját.

Új tudományos eredményként mutattuk be, hogy a γ G-Au NCs optikai paraméterei szisztematikusan hangolhatók az arany atomok 10 m/m%-ának ezüstatomokra történő cseréjével, illetve a szintézis egyéb paramétereinek (fehérje koncentráció, hőmérséklet, fémtartalom, szintézisidő) változtatásával. Az új, 1 μ s-os átlagos élettartammal rendelkező γ G-Au/Ag NCs fluoreszcencia maximuma közel azonos a kiindulási egyfémes származékkal (634 nm a 637 nm helyett), viszont a fluoreszcencia intenzitása közel 2,3-szeresre emelhető, ami javíthatja a képalkotásban és az analitikai célú felhasználásban betöltött szerepét. HR-TEM felvételekkel bizonyítottuk, hogy a klasztermagok $d = 1,61 \pm 0,54$ nm átlagos átmérővel rendelkeznek, míg DLS mérésekkel a fehérjével stabilizált, vizes közegben szolvatált NCs hidrodinamikai átmérőjére $d_H = 6,82 \pm 0,97$ nm értéket határoztunk meg. A tisztított γ G-Au/Ag NCs szerkezeti jellemzése során rámutattunk arra, hogy a fémionok redukciója közel teljes mértékben megvalósul a kidolgozott szintézis során, amit a

klasztermag nominális és ICP-MS mérésekkel meghatározott valós összetételének alig eltérő mértéke igazol. Az ötvözet klasztermag kialakulása elektrokémiai mérések eredményei alapján is valószínűsíthető. Biológiai aktivitást mérő próbákkal megállapítottuk, hogy a NCs még 50 μM koncentráció felett sem rendelkeznek antibakteriális vagy citotoxikus hatással.

Elsőként mutattuk be, hogy a Tf-Au NCs tulajdonságai jelentősen javíthatók ezüst atomok klasztermagba történő beépítésével, ezáltal kétfémes Tf-Au/Ag NCs-et létrehozva. A kétfémes származék szintézise révén a fluoreszcencia intenzitás közel négyszeresére növelhető, míg az emissziós maximum $\lambda_{\text{em}} = 626 \text{ nm}$ -ről 595–610 nm-re módosítható. CD és FT-IR mérések révén igazolást nyert, hogy a fehérje szerkezetét erősen módosítja a NCs kialakulása, jelentősen csökkentve a rendezett másodlagos szerkezeti elemek (különösen az α -hélix) arányát. TEM mérésekkel a fémmagok méretére $2,0 \pm 0,3 \text{ nm}$ -t, míg DLS mérésekkel a fehérjével stabilizált nanoszerkezet hidrodinamikai átmérőjére $7,2 \pm 0,6 \text{ nm}$ értéket határoztunk meg. Fluorimetria, élettartammérések, valamint jodidionnal történő kioltási reakciók vizsgálatával igazoltuk, hogy a NCs emisszióját döntően két folyamat szolgáltatja: az egyik a fémmagból származó átmenet, amit 583 nm-es emissziós hullámhossz és 250 ns élettartam jellemez, míg a legnagyobb részt a 670 nm emissziós hullámhosszú, 1,56 μs élettartamú ligandum-fém átmenet adja.

Az analitikai érzékelés területén megmutattuk, hogy a Tf-Au/Ag NCs-ek erősítési reakcióban mutatható ki a kinurenin-körhöz tartozó molekulák közül a 3-hidroxiantranilsav (3-HAA). Koncentrációfüggést vizsgáló kísérletekkel meghatároztuk a LOD értékét, melyre PBS közegben 0,55 μM , míg aCSF közegben 0,32 μM érték adódott, ami jelentősen alacsonyabb hasonló analitikai alkalmazásokhoz képest ($\gamma\text{G-Au NCs} + L\text{-kinurenin}$: 15–22 μM , $\gamma\text{G-Au/Ag NCs} + \text{kinurénsav}$: 60–80 μM). Vizsgálatainkat hígított emberi vészérum közegben is elvégeztük, bemutatva a NCs biológiai közegben történő alkalmazását. A 3-HAA, a Tf és a Tf-Au/Ag NCs közötti kölcsönhatás ITC mérésekkel vizsgálva bizonyítottuk, hogy a Tf-nel nincs kimérhető kölcsönhatás, míg a NCs esetében az egyértelműen kimutatható. A reakció termodinamikai paramétereinek értelmezése során igazoltuk, hogy termodinamikailag kedvezményezett ($\Delta G^0 = -36,2 \text{ kJ/mol}$), endoterm ($\Delta H^0 = +13,1 \text{ kJ/mol}$) és entrópia-vezérelt ($\Delta S^0 = 165 \text{ J/mol K}$). Az alkalmazott modell alapján egy kötőhelyet feltételezhetünk ($N = 1,03$) a NCs-et stabilizáló fehérje felületén, $K_a = 2,17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ kötési állandóval.

7. Summary

Noble metal nanoclusters (NCs) are boundary materials between molecules and classic noble metal nanoparticles (NPs), as they possess unique optical properties like photoluminescence (fluorescence or phosphorescence). Another interesting fact is when NCs are built up from two metals, which causes the structure, optical and catalytical properties of the product to differ from the characteristics of the monometallic NCs. Application of NCs in the medical field requires them to be biocompatible, which can be ensured by using appropriate stabilizing molecules, such as aminoacids or proteins. At the start of my PhD work our research group only had one publication on the topic of bimetallic NCs, so we aimed to develop new bimetallic Au/Ag NCs stabilized with proteins. Our main target was the enhancement of the fluorescence intensity of the NCs, which we wished to accomplish by systematically varying the synthesis parameters. The purified and thoroughly characterized bimetallic systems (together with the monometallic NCs) were employed in different application fields. We investigated their application as fluorescent labeling materials for colloidal drug carrier particles, and in the field of the selective analytical sensing of tryptophan metabolites.

During the PhD studies we first presented the possible synthesis of Au/Ag NCs stabilized with BSA and LYZ at room temperature, using the template method in aqueous medium. By modifying the synthesis parameters systematically, the product will have enhanced, 5–7 times higher fluorescence (comparing at similar metal concentrations). By changing 3–10 w% of gold atoms to silver, the emission maximum of BSA-Au/Ag NCs shifts from $\lambda_{em} = 660$ nm to 620 nm, while in the case of antibacterial LYZ, bimetallic Au/Ag NCs with $\lambda_{em} = 570$ or 600 nm can be achieved. We were the first in the literature to point out the possibility of synthesizing two (orange and yellow) fluorescent LYZ-Au/Ag NCs using the template method.

The optical and structural properties of the purified bimetallic NCs were investigated, and we verified that all of the products possess average fluorescent lifetimes in the μ s range (based on 3-parameter fitting). By the incorporation of silver, due to synergistic effects the internal QY of the NCs increased to as high as 7.5 % from the value of 1.5 % of the Au NCs. XPS measurements clearly proved the presence of metallic gold in the NCs, while CD and FT-IR measurements proved the disrupting effect of NC-formation on the secondary structure of the stabilizing proteins. In the case of BSA-Au/Ag NCs antibacterial and

cytotoxicity assays proved that these materials do not show any biological activity ($IC_{50} > 50 \mu M$).

We were the first to utilize fluorescent mono- and bimetallic NCs for the labeling of Chit/HyA drug carrier particles. We confirmed that the type of stabilizing protein is not determining, as both BSA- and LYZ-Au NCs interacting with the carrier NPs cause aggregation at very low $m_{NC}:m_{particle}$ ratios (< 0.15). Using bimetallic NCs gives more stable "complex" particles up to $\sim 1,5 m_{NC}:m_{particle}$ ratios, which can be explained by the larger amount of stabilizing proteins in the bimetallic systems. We also showed that using BSA-stabilized NCs cause more significant aggregation at similar weight ratios. We could determine significant (~ 2.8 times) fluorescence enhancement in the case of LYZ-Au NCs in the presence of the colloidal carriers, which is due to the effect of AIE. Comparing the effect of the structure of the carrier particles we can state that the presence of a larger amount of negatively charged HyA on the surface of core-shell type systems are more available for LYZ-stabilized NCs. The polysaccharide molecules were capable of restricting the free movement of the LYZ molecules, somehow decreasing the chance of non-radiative decay processes, thus increasing the fluorescence of the NCs.

As a new scientific result we showed that the optical properties of γG -Au NCs can be systematically tuned by changing 10 w% of gold atoms to silver, and by modifying other synthesis parameters (protein concentration, temperature, metal content and synthesis time). The new γG -Au/Ag NCs possessing 1 μs average lifetime have similar emission maximum as the original monometallic counterparts (634 nm compared to 637 nm), but their fluorescence intensity is 2.3 times higher, which can improve their performance in potential imaging and sensing applications. HR-TEM images proved that the NC cores have a diameter of 1.61 ± 0.54 nm, while DLS measurements showed $d_H = 6.82 \pm 0.97$ nm values for the protein-stabilized NCs dispersed in the aqueous phase. During the structural characterization of purified γG -Au/Ag NCs we confirmed the almost complete reduction of the metal ions, which was made clear with ICP-MS measurements showing almost identical metal compositions as the nominal value. Based on electrochemical measurements, the formation of alloyed NC cores was also suggested. Using assays measuring biological activity we confirmed that the NCs do not have any antibacterial or cytotoxic effect even at very high concentrations ($> 50 \mu M$).

We were the first to show that by the incorporation of silver atoms into the metallic cores of Tf-Au NCs their properties can be significantly improved. Due to the creation of

the bimetallic product the fluorescence intensity can be increased 4 times, while the emission maximum can be shifted from $\lambda_{em} = 626$ nm to 595–610 nm. Based on CD and FT-IR measurements we verified that the formation of NCs greatly influences the structure of the protein, significantly lowering the contribution of ordered structure elements (especially α -helices). TEM measurements gave average diameters of 2.0 ± 0.3 nm for the NC cores, while DLS results were $d_H = 7.2 \pm 0.6$ nm for the protein-stabilized nanostructures. Fluorometry, lifetime measurements and quenching reactions with iodide were used to confirm that NC-emissions came from two major processes: one from the metal cores, situated at $\lambda_{em} = 583$ nm with a lifetime of 250 ns, while the largest contribution comes from a LMCT/LMMCT process at $\lambda_{em} = 670$ nm with a lifetime of 1.56 μ s.

In the field of analytical sensing we showed that Tf-Au/Ag NCs can detect the presence of 3-hydroxyanthranilic acid from the kynurenic pathway in a fluorescence enhancement reaction. Concentration-dependent measurements were performed to determine the LOD value, which was 0.55 μ M in PBS and 0.32 μ M in aCSF media. These values are significantly lower compared to similar applications (γ G-Au NCs/*L*-kynurenine: 15–22 μ M, γ G-Au/Ag NCs/kynurenic acid: 60–80 μ M). Our measurements were also conducted in diluted human serum, showing the applicability of NCs in biological samples. The reaction between 3-HAA, Tf and Tf-Au/Ag NCs were investigated using ITC measurements. We confirmed that there is no detectable reaction with Tf, while there is a definite one with the NCs. The thermodynamic parameters were as follows: $\Delta G^0 = -36.0$ kJ/mol (thermodynamically favored), $\Delta H^0 = +13.1$ kJ/mol (endothermic), $\Delta S^0 = 165$ J/mol K (entropy-driven). Based on the used model we suggested one binding site ($N = 1,03$) on the surface of the stabilizing protein, with a binding constant of $K_a = 2.17 \times 10^6$ M⁻¹.

8. Irodalomjegyzék

- 1 F. Szántó, *A kolloidkémia alapjai*, Gondolat Kiadó, Budapest, 1st edn., 1987.
- 2 D. J. . Shaw, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, Butterworth-Heinemann, 3rd edn., 1981.
- 3 A. Polman and H. A. Atwater, *Mater. Today*, 2005, **8**, 56.
- 4 J. Zheng, C. Zhou, M. Yu and J. Liu, *Nanoscale*, 2012, **4**, 4073.
- 5 G. Mie, *Ann. Phys.*, 1908, **330**, 377–445.
- 6 M. M. Ghobashy, S. A. Alkhursani, H. A. Alqahtani, T. K. El-damhougy and M. Madani, *Mater. Sci. Eng. B*, 2024, **301**, 117191.
- 7 W. Theansun, C. Sriprachuabwong, L. Chuenchom, P. Prajongtat, S. Techasakul, A. Tuantranont and D. Dechtrirat, *Bioelectrochemistry*, 2023, **149**, 108305.
- 8 M. Haruta, T. Kobayashi, H. Sano and N. Yamada, *Chem. Lett.*, 1987, **16**, 405–408.
- 9 G. HUTCHINGS, *J. Catal.*, 1985, **96**, 292–295.
- 10 C. Zhang, F. Zhang, M. Han, X. Wang, J. Du, H. Zhang and W. Li, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 22015.
- 11 M. Westphalen, U. Kreibig, J. Rostalski, H. Lüth and D. Meissner, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 2000, **61**, 97–105.
- 12 D. Zheng, C. Schwob, Y. Prado, Z. Ouzit, L. Coolen and T. Pauporté, *Nano Energy*, 2022, **94**, 106934.
- 13 K. A. Willets and R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2007, **58**, 267–297.
- 14 S. Fedrigo, W. Harbich and J. Buttet, *Phys. Rev. B*, 1993, **47**, 10706–10715.
- 15 D. M. Cox, D. J. Trevor, R. L. Whetten, E. A. Rohlfing and A. Kaldor, *Phys. Rev. B*, 1985, **32**, 7290–7298.
- 16 I. M. L. Billas, J. A. Becker, A. Châtelain and W. A. de Heer, *Phys. Rev. Lett.*, 1993, **71**, 4067–4070.
- 17 J. P. Bucher, D. C. Douglass and L. A. Bloomfield, *Phys. Rev. Lett.*, 1991, **66**, 3052–3055.
- 18 S. E. Apsel, J. W. Emmert, J. Deng and L. A. Bloomfield, *Phys. Rev. Lett.*, 1996, **76**, 1441–1444.
- 19 M. Agrachev, M. Ruzzi, A. Venzo and F. Maran, *Acc. Chem. Res.*, 2019, **52**, 44–52.
- 20 K. Bharti, J. K. Sahu and K. K. Sadhu, *Mater. Adv.*, 2022, **3**, 5698–5724.
- 21 J. Xie, Y. Zheng and J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 888–889.
- 22 H. Yamamoto, H. Yano, H. Kouchi, Y. Obora, R. Arakawa and H. Kawasaki, *Nanoscale*, 2012, **4**, 4148.
- 23 Y. Xiao, Z. Wu, Q. Yao and J. Xie, *Aggregate*, 2021, **2**, 114–132.
- 24 M. Laurent-Brocq, F. Legendre, M.-H. Mathon, A. Mascaro, S. Poissonnet, B. Radiguet, P. Pareige, M. Loyer and O. Leseigneur, *Acta Mater.*, 2012, **60**, 7150–7159.
- 25 S. R. Biltek, S. Mandal, A. Sen, A. C. Reber, A. F. Pedicini and S. N. Khanna, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 26–29.
- 26 X.-K. Wan, X.-L. Cheng, Q. Tang, Y.-Z. Han, G. Hu, D. Jiang and Q.-M. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 9451–9454.
- 27 Y. Wang, X.-K. Wan, L. Ren, H. Su, G. Li, S. Malola, S. Lin, Z. Tang, H. Häkkinen, B. K. Teo, Q.-M. Wang and N. Zheng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 3278–3281.
- 28 Q. Sha, B. Sun, C. Yi, R. Guan, J. Fei, Z. Hu, B. Liu and X. Liu, *Sensors Actuators B Chem.*, 2019, **294**, 177–184.
- 29 J. Li, Y. Song, Y. Wang and H. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 50365–50376.
- 30 H. Liu, X. Zhang, X. Wu, L. Jiang, C. Burda and J.-J. Zhu, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 4237.
- 31 R. Ghosh, A. K. Sahoo, S. S. Ghosh, A. Paul and A. Chattopadhyay, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 3822–3828.
- 32 M. J. Hostetler, C.-J. Zhong, B. K. H. Yen, J. Andereg, S. M. Gross, N. D. Evans, M. Porter and R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 9396–9397.

- 33 M.-M. Yin, W.-Q. Chen, Y. Liu and F.-L. Jiang, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2019, **2**, 408–417.
- 34 M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin and R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 801–802.
- 35 A. Murugadoss, N. Kai and H. Sakurai, *Nanoscale*, 2012, **4**, 1280.
- 36 G. Gombár, D. Ungor, G. F. Samu, O. Dömötör and E. Csapó, *J. Mol. Liq.*, 2022, **359**, 119372.
- 37 X. Yang, Y. Feng, S. Zhu, Y. Luo, Y. Zhuo and Y. Dou, *Anal. Chim. Acta*, 2014, **847**, 49–54.
- 38 S. Bhunia, S. Kumar and P. Purkayastha, *SN Appl. Sci.*, 2019, **1**, 449.
- 39 D. Ungor, I. Szilágyi and E. Csapó, *J. Mol. Liq.*, 2021, **338**, 116695.
- 40 J. Yang, N. Song and Q. Jia, *Microchim. Acta*, 2019, **186**, 70.
- 41 C. Deraedt, G. Melaet, W. T. Ralston, R. Ye and G. A. Somorjai, *Nano Lett.*, 2017, **17**, 1853–1862.
- 42 Y.-T. Su, G.-Y. Lan, W.-Y. Chen and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 8566–8572.
- 43 X. Wang and S. Zhang, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2022, **649**, 129458.
- 44 S. Borse, Z. V. P. Murthy and S. K. Kailasa, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2023, **415**, 335–343.
- 45 Z. Liu, X. Wang, X. Ren, W. Li, J. Sun, X. Wang, Y. Huang, Y. Guo and H. Zeng, *Food Chem.*, 2021, **355**, 129633.
- 46 D. Ungor, K. Horváth, I. Dékány and E. Csapó, *Sensors Actuators B Chem.*, 2019, **288**, 728–733.
- 47 B. Li, J. Li and J. Zhao, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2015, **134**, 40–47.
- 48 C.-J. Yu, T.-H. Chen, J.-Y. Jiang and W.-L. Tseng, *Nanoscale*, 2014, **6**, 9618–9624.
- 49 S. Borse, Z. V. P. Murthy and S. K. Kailasa, *Opt. Mater. (Amst.)*, 2020, **107**, 110085.
- 50 Y. Noh, E.-J. Jo, H. Mun, Y. Ahn and M.-G. Kim, *Chemosphere*, 2017, **174**, 524–530.
- 51 S. Pollitt, E. Pittenauer, C. Rameshan, T. Schachinger, O. V. Safonova, V. Truttmann, A. Bera, G. Allmaier, N. Barrabés and G. Rupprechter, *J. Phys. Chem. C*, 2017, **121**, 10948–10956.
- 52 J. Ji, G. Wang, T. Wang, X. You and X. Xu, *Nanoscale*, 2014, **6**, 9185.
- 53 D. Bahari, B. Babamiri and A. Salimi, *J. Iran. Chem. Soc.*, 2020, **17**, 2283–2291.
- 54 S. Bhat, I. Chakraborty, T. A. Maark, A. Mitra, G. De and T. Pradeep, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 26679–26688.
- 55 S.-B. He, M.-T. Lin, L. Yang, H. A. A. Noreldeen, H.-P. Peng, H.-H. Deng and W. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, **13**, 44541–44548.
- 56 Z. Wu and R. Jin, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 2568–2573.
- 57 L.-Y. Chen, C.-W. Wang, Z. Yuan and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 216–229.
- 58 D. Ungor, I. Dékány and E. Csapó, *Nanomaterials*, 2019, **9**, 1229.
- 59 E. Csapó, D. Ungor, Z. Kele, P. Baranyai, A. Deák, Á. Juhász, L. Janovák and I. Dékány, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2017, **532**, 601–608.
- 60 G. Gombár, P. Simon, D. Ungor, I. Szatmári and E. Csapó, *J. Mol. Liq.*, 2023, **387**, 122597.
- 61 H. Zhang, T. Watanabe, M. Okumura, M. Haruta and N. Toshima, *Nat. Mater.*, 2012, **11**, 49–52.
- 62 H.-H. Deng, L.-N. Zhang, S.-B. He, A.-L. Liu, G.-W. Li, X.-H. Lin, X.-H. Xia and W. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **65**, 397–403.
- 63 E. Csapó, D. Ungor, Á. Juhász, G. K. Tóth and I. Dékány, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2016, **511**, 264–271.
- 64 J. Zheng, C. Zhang and R. M. Dickson, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **93**, 077402.
- 65 P. Sarkar, M. Saha, N. Nandi, D. K. Sahu and K. Sahu, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2022, **5**, 7670–7678.
- 66 U. Goswami, A. Dutta, A. Raza, R. Kandimalla, S. Kalita, S. S. Ghosh and A. Chattopadhyay, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 3282–3294.
- 67 E. Mahmoudi, A. Hajian, M. Rezaei, A. Afkhami, A. Amine and H. Bagheri, *Microchem. J.*, 2019, **145**, 242–251.

- 68 A. N. Kovács, N. Varga, J. Bogner, Á. Juhász and E. Csapó, *J. Mol. Liq.*, 2024, **398**, 124271.
- 69 H. Sun, T. Qing, X. He, J. Shangguan, R. Jia, H. Bu, J. Huang and K. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1070**, 88–96.
- 70 L. R. Wetter and H. F. Deutsch, *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 237–242.
- 71 D. Ghosh, A. Baksi, S. K. Mudedla, A. Nag, M. A. Ganayee, V. Subramanian and T. Pradeep, *J. Phys. Chem. C*, 2017, **121**, 13335–13344.
- 72 V. Hornok, E. Csapó, N. Varga, D. Ungor, D. Sebők, L. Janovák, G. Laczkó and I. Dékány, *Colloid Polym. Sci.*, 2016, **294**, 49–58.
- 73 S. Pang and S. Liu, *Anal. Methods*, 2017, **9**, 6713–6718.
- 74 E. Baricza, E. Buzás, A. Falus and G. Nagy, *MediArt*, 2012, **1**, 3–6.
- 75 A. Elkak, T. Yehya, I. Salloub and F. Berry, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2012, **17**, 584–590.
- 76 X. Le Guével, N. Daum and M. Schneider, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 275103.
- 77 G. Spik, B. Bayard, B. Fournet, G. Strecker, S. Bouquelet and J. Montreuil, *FEBS Lett.*, 1975, **50**, 296–299.
- 78 G. Ran, X. Chen and Y. Xia, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 1847–1851.
- 79 M. D. Đurović, Ž. D. Bugarčić and R. van Eldik, *Coord. Chem. Rev.*, 2017, **338**, 186–206.
- 80 R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 3533–3539.
- 81 W. Robb, *Inorg. Chem.*, 1967, **6**, 382–386.
- 82 L. Messori, G. Marcon and P. Orioli, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2003, **1**, 177–187.
- 83 Y. Negishi, Y. Takasugi, S. Sato, H. Yao, K. Kimura and T. Tsukuda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6518–6519.
- 84 C. Lavenn, L. Okhrimenko, N. Guillou, M. Monge, G. Ledoux, C. Dujardin, R. Chiriac, A. Fateeva and A. Demessence, *J. Mater. Chem. C*, 2015, **3**, 4115–4125.
- 85 R. E. Bachman, S. A. Bodolosky-Bettis, S. C. Glennon and S. A. Sirchio, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 7146–7147.
- 86 Z. Luo, X. Yuan, Y. Yu, Q. Zhang, D. T. Leong, J. Y. Lee and J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 16662–16670.
- 87 A. A. Isab, A. L. Hormann, D. T. Hill, D. E. Griswold, M. J. DiMartino and C. F. Shaw, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 1321–1326.
- 88 W. Blomstrand, *J. für Prakt. Chemie*, 1859, **77**, 88–119.
- 89 H. E. Roscoe, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1872, **162**, 349–368.
- 90 C. Brosset, *Mineral. och Geol.*, 1945, **20**, 16.
- 91 J. A. Bertrand, F. A. Cotton and W. A. Dollase, *Inorg. Chem.*, 1963, **2**, 1166–1171.
- 92 F. A. Cotton, *Inorg. Chem.*, 1964, **3**, 1217–1220.
- 93 L. Malatesta, *Gold Bull.*, 1975, **8**, 48–52.
- 94 R. Hesse, L. Nilson, C. Larsen, P. H. Nielsen, A. A. Lindberg, G. Jansen, B. Lamm and B. Samuelsson, *Acta Chem. Scand.*, 1969, **23**, 825–845.
- 95 H.-D. Sinnen and H.-U. Schuster, *Zeitschrift für Naturforsch. B*, 1981, **36**, 833–836.
- 96 P. Chini, *J. Organomet. Chem.*, 1980, **200**, 37–61.
- 97 D. M. P. Mingos, *Gold Bull.*, 1984, **17**, 5–12.
- 98 Harshita, T. J. Park and S. K. Kailasa, *Appl. Spectrosc.*, 2025, **79**, 1069–1077.
- 99 R. I. G. Hughes, *Perspect. Sci.*, 2006, **14**, 457–524.
- 100 C. Huang, Z. Yang, K. Lee and H. Chang, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2007, **46**, 6824–6828.
- 101 S. Chen, R. Xie, M. Tian, R. Yan, Z. Wang, R. Xie and F. Chai, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2025, **332**, 125862.
- 102 F.-N. Wu, J. Zhu, G.-J. Weng, J.-J. Li and J.-W. Zhao, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2021, **4**, 13501–13509.
- 103 H. Duan and S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2412–2413.
- 104 C. W. Bradford, W. van Bronswijk, R. J. H. Clark and R. S. Nyholm, *J. Chem. Soc. A*, 1970, 2889–2899.
- 105 J. S. Mohanty, P. L. Xavier, K. Chaudhari, M. S. Bootharaju, N. Goswami, S. K. Pal and T.

- Pradeep, *Nanoscale*, 2012, **4**, 4255.
- 106 A. Baksi, A. Mitra, J. S. Mohanty, H. Lee, G. De and T. Pradeep, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 2148–2157.
- 107 E. Goormaghtigh, J.-M. Ruysschaert and V. Raussens, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 2946–2957.
- 108 Z. Shojaeifard, N. Heidari and B. Hemmateenejad, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, **209**, 202–208.
- 109 H. Chen, L. Lin, H. Li, J. Li and J.-M. Lin, *ACS Nano*, 2015, **9**, 2173–2183.
- 110 K. V. Kong, Z. Lam, W. K. O. Lau, W. K. Leong and M. Olivo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 18028–18031.
- 111 S. Wang, X. Zeng, H. Chen, G. Deng, X. Bai, J. Yang and H. Fu, *Sensors Actuators B Chem.*, 2022, **356**, 131307.
- 112 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, 2006.
- 113 R. Dai, W. Deng, P. Hu, C. You, L. Yang, X. Jiang, X. Xiong and K. Huang, *Microchem. J.*, 2018, **139**, 1–8.
- 114 N. Zhang, Y. Si, Z. Sun, L. Chen, R. Li, Y. Qiao and H. Wang, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 11714–11721.
- 115 D. Ungor, R. Béltéki, K. Horváth, O. Dömötör and E. Csapó, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 9775.
- 116 M. R. Krishnendu, S. Bhagat, V. Jain, D. Mehta and S. Singh, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2025, **245**, 114303.
- 117 T. Feng, Y. Chen, B. Feng, J. Yan and J. Di, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, **206**, 97–103.
- 118 S. Borse, Z. V. P. Murthy, T.-J. Park and S. K. Kailasa, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2021, **4**, 11949–11959.
- 119 D. Ungor, Á. Turcsányi, B. Torma and E. Csapó, *J. Mol. Liq.*, 2024, **402**, 124756.
- 120 L. Orsatti, T. Stiehl, K. Dischinger, R. Speziale, P. Di Pasquale, E. Monteagudo, C. Müller-Tidow, A. Radujkovic, P. Dreger and T. Luft, *Cell Reports Med.*, 2021, **2**, 100409.
- 121 A. N. Kovács, N. Varga, Á. Juhász and E. Csapó, *Carbohydr. Polym.*, 2021, **251**, 117047.
- 122 A. Ostapiuk and E. M. Urbanska, *CNS Neurosci. Ther.*, 2022, **28**, 19–35.
- 123 V. Hornok, Á. Juhász, G. Paragi, A. N. Kovács and E. Csapó, *J. Mol. Liq.*, 2020, **313**, 112869.
- 124 F. Auld, E. L. Maschauer, I. Morrison, D. J. Skene and R. L. Riha, *Sleep Med. Rev.*, 2017, **34**, 10–22.
- 125 D. D. Mousseau, *Metab. Brain Dis.*, 1993, **8**, 1–44.
- 126 K. Diseases, *Serotonin Receptor Agonists (Triptans)*, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012.
- 127 Á. Juhász, G. Gombár, E. F. Várkonyi, M. Wojnicki, D. Ungor and E. Csapó, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, **24**, 16760.
- 128 D. Ungor, A. Barbasz, A. Czyżowska, E. Csapó and M. Oćwieja, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2021, **200**, 111593.
- 129 Á. Turcsányi, N. Varga and E. Csapó, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, **148**, 218–225.
- 130 Á. Turcsányi, D. Ungor and E. Csapó, *Crystals*, 2020, **10**, 1113.
- 131 Á. Turcsányi, D. Ungor, M. Wojnicki and E. Csapó, *J. Mol. Liq.*, 2023, **370**, 121002.
- 132 Z. Király and I. Dekány, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **242**, 214–219.
- 133 G. C. Kresheck, *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **187**, 542–543.
- 134 N. Pajooeshpour, M. Rezaei, A. Hajian, A. Afkhami, M. Sillanpää, F. Arduini and H. Bagheri, *Sensors Actuators B Chem.*, 2018, **275**, 180–189.
- 135 E. A. Ivleva, E. A. Obratsova, E. R. Pavlova, O. V. Morozova, D. G. Ivanov, A. S. Kononikhin and D. V. Klinov, *Mater. Des.*, 2020, **192**, 108771.
- 136 D.-H. Hu, Z.-H. Sheng, P.-F. Zhang, D.-Z. Yang, S.-H. Liu, P. Gong, D.-Y. Gao, S.-T. Fang, Y.-F. Ma and L.-T. Cai, *Nanoscale*, 2013, **5**, 1624.
- 137 S. Wang, X. Meng, A. Das, T. Li, Y. Song, T. Cao, X. Zhu, M. Zhu and R. Jin, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2014, **53**, 2376–2380.

- 138 J. R. Albani, *J. Fluoresc.*, 2014, **24**, 105–117.
- 139 K. Kwak, V. D. Thanthirige, K. Pyo, D. Lee and G. Ramakrishna, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2017, **8**, 4898–4905.
- 140 A. W. P. Vermeer, M. G. E. G. Bremer and W. Norde, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1998, **1425**, 1–12.
- 141 Á. Turcsányi, Á. Juhász and E. Csapó, *Mater. Today Chem.*, 2025, **47**, 102835.
- 142 T.-Q. Yang, B. Peng, B.-Q. Shan, Y.-X. Zong, J.-G. Jiang, P. Wu and K. Zhang, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 261.
- 143 R. Stuart, *Infrared spectroscopy of carbohydrates: a review of the literature*, 1968.
- 144 Y. Wang, J.-T. Chen and X.-P. Yan, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 2529–2535.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Juhászné Dr. Csapó Editnek a doktori képzésben és azon kívül nyújtott motivációt, segítséget, támogatást és hogy a kutatási munkámat az általa vezetett MTA-SZTE Lendület Nemesfém Nanoszerkezetek Kutatócsoportban végezhettem.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Tóth Ágotának, az SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék vezetőjének, hogy a doktori képzés ideje alatt az általa vezetett tanszéken lehetővé tette a disszertációban foglalt kutatómunka elvégzését.

Köszönöm továbbá a Kutatócsoport jelenlegi és korábbi tagjainak, illetve a csoporton kívüli kutatóknak a kutatási, kiértékelési feladatokban való segítséget és támogatást, illetve minden gondolatot, tapasztalatot, ami a disszertáció megírását segítette.

Végezetül köszönöm családomnak, barátaimnak és ismerőseimnek a motiválást és a támogatást, ami nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

.....

Turcsányi Árpád

Publikációs lista

A Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: **10067812**

A doktori munkához kapcsolódó tudományos közlemények:

[1] **Á. Turcsányi**, D. Ungor, E. Csapó; Fluorescent Labeling of Hyaluronic Acid-Chitosan Nanocarriers by Protein-Stabilized Gold Nanoclusters; Crystals; 10(12) (2020) 1113.

<https://doi.org/10.3390/cryst10121113>

Q2, IF = 2,589

[2] **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.

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.121002>

Q1, IF = 5,3

[3] D. Ungor, **Á. Turcsányi**, B. Torma, E. Csapó; Gold/silver bimetallic nanoclusters stabilized by immunoprotein: Tuning the selectivity for identification of kynurenine pathway metabolites; Journal of Molecular Liquids, 402 (2024) 124756.

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124756>

Q1, IF = 5,2

[4] **Á. Turcsányi**, Á. Juhász, E. Csapó; Transferrin-stabilized bimetallic nanoclusters: Design of a new fluorescent biosensor to identify tryptophan metabolites; Materials Today Chemistry, 47 (2025) 102835.

<https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2025.102835>

Q1, IF = 6,7

$\Sigma IF = 19,789$

Egyéb tudományos közlemények:

[5] L. Janovák, **Á. Turcsányi**, É. Bozó, Á. Deák, L. Mérai, D. Sebők, Á. Juhász, E. Csapó, M. M. Abdelghafour, E. Farkas, I. Dékány, F. Bari; Preparation of novel tissue acidosis-responsive chitosan drug nanoparticles: Characterization and in vitro release properties of Ca^{2+} channel blocker nimodipine drug molecules; European Journal of Pharmaceutical Sciences, 123 (2018) 79–88.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.031>

Q1, IF = 3,532

[6] K. Majrik, **Á. Turcsányi**, Z. Pászti, T. Szabó, A. Domján, J. Mihály, A. Tompos, I. Dékány, E. Tálás; Graphite Oxide-TiO₂ Nanocomposite Type Photocatalyst for Methanol Photocatalytic Reforming Reaction; Topics in Catalysis, 61 (2018) 1323–1334.

<https://doi.org/10.1007/s11244-018-0989-z>

Q1, IF = 2,226

[7] 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(7) (2019) 357.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070357>

Q1, IF = 4,421

[8] **Á. Turcsányi**, N. Varga, E. Csapó; Chitosan-modified hyaluronic acid-based nanosized drug carriers; *International Journal of Biological Macromolecules*, 148 (2020) 218–225.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.118>

Q1, IF = 6,953

[9] 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.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.125>

Q1, IF = 8,2

[10] K. W. K. Amin, Á. Deák, M. Csanády, Jr., N. Szemerédi, D. Szabó, **Á. Turcsányi**, D. Ungor, G. Spengler, L. Rovó, L. Janovák; pH-Triggered Hydrogel Nanoparticles for Efficient Anticancer Drug Delivery and Bioimaging Applications; *Pharmaceutics*, 16 (2024) 931.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070931>

Q1, IF = 5,5

ΣIF = 50,621

Függelék

Az antibakteriális aktivitás vizsgálatokhoz felhasznált baktériumok: Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection – ATCC – 25923) mint meticillin-érzékeny sejtvonala; meticillin-rezisztens *S. aureus* (ATCC 43300, MRSA); Gram-negatív *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Klebsella pneumoniae* (ATCC 700603). Antibakteriális hatást felmérő esszé: Mueller Hinton Broth közeg.

A citotoxicitás vizsgálatokhoz alkalmazott anyagok és reagensek: Doxorubicin-érzékeny Colo205 sejtvonala (CCL-222, LGC Promochem, Teddington, UK); CCD-19Lu emberi normál kötőszöveti (fibroblaszt) sejtvonala (CCL-210, American Type Culture Collection, ATCC). Sejttenyésztés: RPMI-1640 tenyésztő közeg, hővel inaktivált embrionális marha széruma (FBS), *L*-glutamin, nátrium-piruvát, HEPES puffer, nisztatin, penicillin-sztreptomycin keverék, Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) tenyésztő közeg, nem esszenciális aminosav keverék (NEAA). Esszéhez: 0,25 % Trypsin-Versene (EDTA) oldat, tiazolil kék tetrazólium-bromid (MTT, 5 mg/ml PBS-ben), nátrium-dodecilszulfát (NaDS, 10 % oldat 0,01 M HCl-ban), doxorubicin.

Antibakteriális hatás meghatározása

A NCs minimális inhibíciós koncentrációját (MIC) 96 lyukú lemezekben határozták meg, követve a Klinikai és Laboratóriumi Standard Intézmény (CLSI) irányelveit. A minták törzsoldatait 100 µl-re hígították Mueller Hinton Broth közeggel. Ezt követően ugyanebben a közegben egy éjszakán át inkubált baktériumkultúra 10^{-4} hígítását adták minden lyukba 100 µl mennyiségben, kivéve a közeg kontroll lyukakat. A lemezeket ezt követően 37 °C-on 18 órán át inkubálták. Az inkubációs időszak letelte után az MIC értékeket egyszerű vizuális ellenőrzéssel állapították meg.

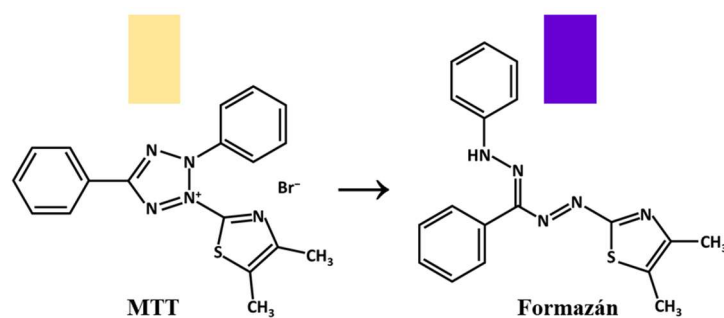
Citotoxikus hatás ellenőrzése (esszé): A Colo205 sejttenyészetet RPMI-1640 közegben növesztették, ami ki lett egészítve 10 % hővel inaktivált embrionális marha szérummal (FBS), 2 mM *L*-glutaminnal, 1 mM Na-piruváttal, 10 mM HEPES pufferrel, 100 U/l nisztatinnal és 10 mg/l penicillin-sztreptomycin keverékkel. Ezeket a sejtvonalaikat 37 °C-on inkubálták 95 % levegő – 5 % CO₂ elegyben. A CCD-19Lu sejteket Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) közegben tenyésztették, amiben 10 % hővel inaktivált embrionális marha szérum, 1 % nem esszenciális aminosav keverék (NEAA), 2 mM *L*-glutamin, 1 mM Na-piruvát, illetve nisztatin és penicillin-sztreptomycin keverék volt

100 U/l és 10 mg/l koncentrációkban. A sejtvonalak a Colo205 sejtekkel azonos körülmények mellett voltak inkubálva. A kísérletekhez felhasznált sejteket 0,25 %-os Trypsin-Versene (EDTA) oldattal választották szét (5 perc, 37 °C). A tapadó CCD-19Lu sejtek a teszt előtt 24 óráig lapos aljú 96 lyukú mikrotiter lemezeken lettek rakva, szemben a félig tapadó Colo205 sejtekkel. A sejtszám az egyes lyukakban $1 \cdot 10^4$ volt 100 μ l tápközegben mindkét sejtvonal esetén. A NC-törzsszuspenziókból hígítási sorokat készítettek a lemez lyukaiban az esszé elvégzése előtt. A CCD-19Lu sejtek esetében a hígításokat egy külön lyuksorozatban végezték el, majd ezekből helyezték a mintatérfogatot a lyukakba, amikben a tapadó sejtek voltak. Minden lyukban a végső térfogat 200 μ l volt az egyes sejtvonalakra. A tenyésztéseket 37 °C-on 72 órán keresztül inkubálták, majd az inkubációs időszak végén 20 μ l MTT festék (tiazolil-kék tetrazólium-bromid) oldatát adták minden lyukhoz (a festék törzsoldat koncentrációja 5 mg/ml volt PBS-ben). Ezt a lépést további 4 órás inkubáció követte 37 °C-on, majd a lyukakhoz 100 μ l Na-dodecil-szulfát oldat lett adva (10 %-os oldat 0,01 M HCl-ban), és ezután még egy éjszakán át inkubálva lettek. A módszer lényege, hogy az életképes sejtek felveszik a sárga színű MTT festéket (**F1. ábra**), és metabolizmusuk során lila színű formazán festékké alakítják. A formazán koncentrációja (és ezzel arányosan abszorbanciája) arányos az élő sejtek számával. A sejtnövekedést az optikai denzitás (OD) 550 nm hullámhosszon történő mérésével határozták meg (a referencia hullámhossz 630 nm volt), ehhez egy Multiscan EX ELISA olvasót (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, USA). Az OD a következő összefüggés szerint számolható (**F1. egyenlet**, jelölések a **17. ábra** alapján):

$$OD = \lg \frac{I_0}{I_T + I_S} \quad (F1)$$

Az IC50 értékeket a GraphPad Prism szoftverrel (5.00 verzió Windows operációs rendszerekhez, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) számoltuk ki, nemlineáris regressziós görbe illesztésével.

Az antibakteriális aktivitást és citotoxikus hatást felmérő esszékhez használt törzs diszperziók a következők voltak (a koncentrációk a névleges fehérje koncentrációkat jelentik, azok korábban megadott molekulatömegeivel számolva): γ G-Au NCs, LYZ-Au NCs: 867 μ M; Tf-Au NCs: 348 μ M; γ G-Au/Ag NCs: 324 μ M; doxorubicin (DOX, pozitív kontrol): 2 mg/ml. A mérsékek kivitelezéséhez használt kezdeti koncentráció 50 μ M volt, a DOX esetén 8,621 μ M.



F1. ábra: A citotoxikus hatást mérő esszé esetén végbemenő reakció

F1. táblázat: Élettartammérések eredményei négyparaméteres illesztéssel a LYZ-I-Au/Ag NCs-re az 540–700 nm tartományban

Illesztés négy paraméterrel					
λ (nm)	540	580	620	660	700
τ_1 (ns)	1,05	5,49	6,49	26,32	4,83
τ_2 (ns)	5,27	90,54	377,9	402,7	400,0
τ_3 (μ s)	0,088	0,450	1,96	2,54	2,94
τ_4 (μ s)	0,827	1,36	11,70	11,17	11,09
A_1 (%)	21,57	5,43	0,44	0,04	0,04
A_2 (%)	17,75	3,20	3,40	0,89	0,86
A_3 (%)	7,61	11,33	39,59	17,79	20,36
A_4 (%)	53,07	80,04	56,57	81,28	78,74
χ^2	1,266	1,172	1,260	1,215	1,141

F2. táblázat: Élettartammérések eredményei kétparaméteres illesztéssel a LYZ-II-Au/Ag NCs-re az 540–700 nm tartományban

Illesztés két paraméterrel					
λ (nm)	540	580	620	660	700
τ_1 (ns)	3,85	5,72	6,54	7,01	6,10
τ_2 (μ s)	0,444	0,712	0,919	1,07	1,10
A_1 (%)	39,29	12,52	4,78	2,96	2,85
A_2 (%)	60,71	87,48	95,22	97,04	97,15
χ^2	0,9113	1,351	1,219	1,168	1,048

F3. táblázat: Élettartammérések eredményei háromparaméteres illesztéssel a LYZ-II-Au/Ag NCs-re az 540–700 nm tartományban

Illesztés három paraméterrel					
λ (nm)	540	580	620	660	700
τ_1 (ns)	2,78	2,86	3,50	4,78	1,80
τ_2 (ns)	113,3	278,1	245,6	401,0	72,09
τ_3 (μ s)	0,736	1,21	1,52	1,76	1,12
A_1 (%)	39,25	8,87	3,28	2,07	3,88
A_2 (%)	12,58	23,12	11,96	13,41	2,78
A_3 (%)	48,17	68,01	84,76	84,52	93,34
χ^2	1,682	1,236	1,108	1,102	1,000

F4. táblázat: Élettartammérések eredményei a fehérje csúcsára a LYZ-I és LYZ-II-Au/Ag NCs-re a 440–480 nm tartományban, illetve a Trp fluoreszcens élettartamai vízben, etanolban és megadott fehérjékben ¹³⁸

λ (nm)	LYZ-I	LYZ-II	LYZ-II			Trp vízben	Trp etanolban	Trp fehérjében	
	3 paraméter		4 paraméter					min	max
	480	480	440	460	480	350	338	325–340	
τ_1 (ns)	0,417	1,028	0,291	0,311	0,343	0,430	0,152	0,240	0,860
τ_2 (ns)	2,45	4,01	1,52	1,60	1,74	3,06	1,78	1,25	3,57
τ_3 (ns)	7,90	13,53	4,42	4,68	4,99	-	4,87	3,41	9,20
τ_4 (ns)	-	-	11,8	13,4	15,6	-	-	-	-
A_1 (%)	24,48	42,45	13,73	12,71	14,21	4,71	18,56	4,73	35,70
A_2 (%)	49,99	49,05	31,32	34,33	37,32	95,29	70,07	25,70	60,30
A_3 (%)	25,53	8,50	47,78	45,94	41,76	-	11,37	9,00	69,60
A_4 (%)	-	-	7,17	7,02	6,71	-	-	-	-
χ^2	1,758	2,375	1,376	1,340	1,270	1,008	1,004	1,006	1,167

F5. táblázat: Élettartammérések eredményei háromparaméteres illesztéssel a γ G-Au/Ag NCs-re az 540–740 nm tartományban

λ (nm)	Illesztés 3 paraméterrel					
	540	580	620	660	700	740
τ_1 (ns)	1,63	9,23	23,77	36,77	20,10	2,36
τ_2 (ns)	8,38	263,1	299,1	503,9	456,6	140,5
τ_3 (μ s)	0,336	1,22	1,41	1,75	1,91	1,89
A_1 (%)	33,94	4,94	1,21	0,74	0,61	0,15
A_2 (%)	19,49	23,47	13,59	15,41	9,78	1,94
A_3 (%)	46,57	71,59	85,20	83,85	89,61	97,91
χ^2	1,146	1,369	1,157	1,013	1,181	1,024

F6. táblázat: Élettartammérések eredményei a fehérje csúcsára a γ G-Au/Ag NCs-re a 440–480 nm tartományban, 3 és 4 paraméter felhasználásával

λ (nm)	γ G-Au/Ag NCs					
	3 paraméter			4 paraméter		
	440	460	480	440	460	480
τ_1 (ns)	0,457	0,489	0,448	0,267	0,254	0,305
τ_2 (ns)	2,47	2,65	2,54	1,21	1,20	1,44
τ_3 (ns)	7,15	7,84	7,86	3,65	3,84	4,09
τ_4 (ns)	-	-	-	9,07	9,95	10,30
A_1 (%)	20,75	22,24	21,08	10,34	9,71	13,27
A_2 (%)	50,20	50,91	49,61	25,47	26,23	27,72
A_3 (%)	29,05	26,85	29,31	48,04	48,93	43,79
A_4 (%)	-	-	-	16,15	15,13	15,22
χ^2	1,264	1,277	1,199	1,129	1,083	1,061

F7. táblázat: Élettartammérések eredményei háromparaméteres illesztéssel a Tf-Au/Ag NCs-re az 540–740 nm tartományban

λ (nm)	Illesztés 3 paraméterrel								
	540	580	600	620	640	660	700	720	740
τ_1 (ns)	3,97	6,05	21,63	71,16	109,8	193,2	118,0	111,7	37,23
τ_2 (ns)	65,03	150,7	219,1	1119,7	1435,5	1597,2	1657,2	1850,7	886,5
τ_3 (μ s)	0,656	1,19	1,28	6,87	5,77	5,63	5,19	4,94	5,15
A_1 (%)	27,15	3,48	1,54	2,19	2,25	2,61	1,04	1,18	0,30
A_2 (%)	14,15	11,15	9,60	56,22	61,98	54,27	39,32	38,89	14,50
A_3 (%)	58,70	85,37	88,86	41,59	35,77	43,12	59,64	59,93	85,20
χ^2	1,287	1,131	1,215	1,245	1,314	1,188	1,156	1,100	1,083

F8. táblázat: Élettartammérések eredményei a fehérje csúcsára a Tf-Au/Ag NCs-re a 440–500 nm tartományban 4 paraméter, illetve 500 nm-en 3 paraméter felhasználásával

Paraméterek	Tf-Au/Ag NCs				
	4				3
λ (nm)	440	460	480	500	500
τ_1 (ns)	0,137	0,268	0,309	0,273	0,658
τ_2 (ns)	0,888	1,11	1,29	1,23	3,28
τ_3 (ns)	3,28	3,47	3,58	4,05	12,95
τ_4 (ns)	9,22	9,43	9,82	12,21	-
A_1 (%)	8,30	13,05	16,97	13,52	55,98
A_2 (%)	27,52	27,35	27,27	29,00	34,90
A_3 (%)	46,81	42,96	39,52	43,43	9,12
A_4 (%)	17,37	16,64	16,24	14,05	-
χ^2	1,198	1,201	1,207	1,192	1,392