

Elektrolitok és polielektrolitok hatása CeO₂ nanozyme részecskék kolloidstabilitására és enzimutánzó aktivitására

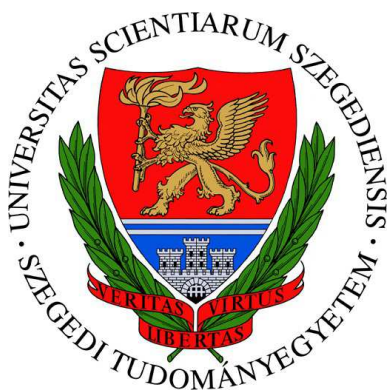
Viczián Dániel

Kémia BSc, II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Szilágyi István

egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

MTA-SZTE „Lendület” Biokolloidok Kutatócsoport

Lezárva: 2025. 01. 07.

TARTALOM

1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Irodalmi összefoglalás	3
2.1. Természetes antioxidánsok.....	3
2.2. Nanozyme-ok	4
2.3. Kolloid rendszerek stabilitása.....	5
2.4. Ionspecifikus hatások.....	8
2.5. Nanorészecskék funkcionálizálása polielektrolitokkal.....	9
3. Célkitűzések.....	10
4. Kísérleti rész	11
4.1. Felhasznált eszközök	11
4.2. Felhasznált anyagok.....	11
4.3. A CeO ₂ nanorészecskék előállítása.....	12
4.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia	12
4.5. Dinamikus fényszórásmérés.....	12
4.6. Elektroforetikus fényszórásmérés.....	15
4.7. UV-látható spektrofotometria	16
4.8. Peroxidáz teszt.....	16
5. Eredmények.....	18
5.1. A CeNPs karakterizálása	18
5.2. Kolloidkémiai tulajdonságok vizsgálata oldott sók jelenlétében	20
5.2.1. Kolloidstabilitás bázikus közegben	20
5.2.2. Kolloidstabilitás savas közegben.....	23
5.3. A CeNPs funkcionálizálása polielektrolitokkal.....	25
5.3.1. Funkcionálizálás bázikus közegben.....	26
5.3.2. Funkcionálizálás savas közegben	27
5.3.3. A funkcionálizált CeNPs ionerősség-függő kolloidstabilitása	29
5.4. Az enzimutánzó aktivitás felmérése	32
5.4.1. Oldott sók hatása a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitására.....	32
5.4.2. Polielektrolitok hatása a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitására	36
6. Összegzés.....	38
7. Irodalomjegyzék.....	39
8. Köszönetnyilvánítás.....	43

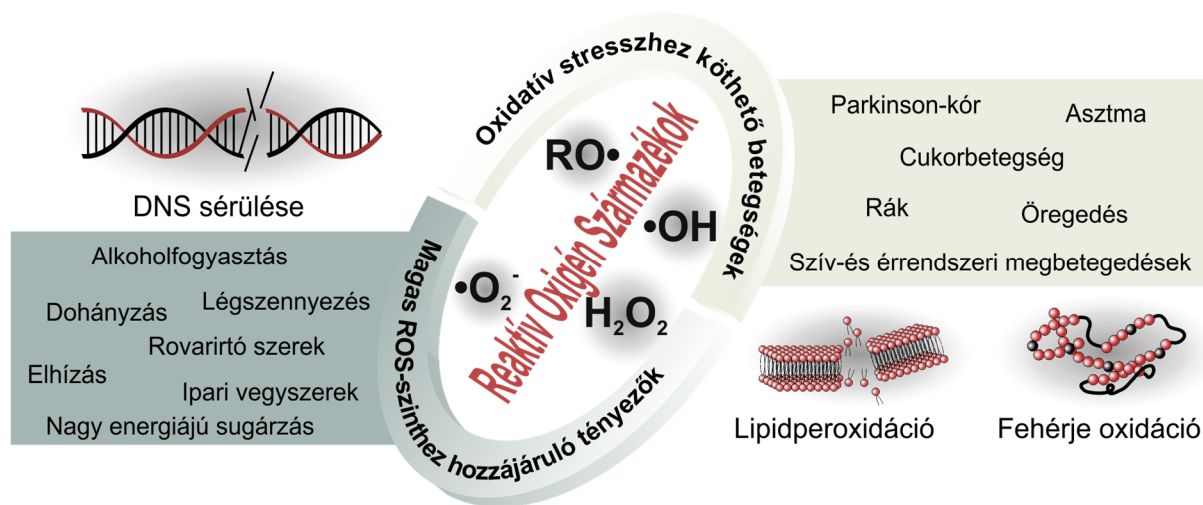
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ASP	Adszorpciós telítési plató
CAT	Kataláz enzim
CCC	Kritikus koaguláltató koncentráció
CeNPs	CeO ₂ nanorészecskék
DLS	Dinamikus fényszórás
DLVO	Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EPM	Elektroforetikus mobilitás
ELS	Elektroforetikus fényszórás
HEP	Heparin
HEP-Ce	Heparinnal funkcionizált CeO ₂ nanorészecskék
HRP	Torma peroxidáz enzim
IEP	Izoelektromos pont
MGC	Metil-glikol-kitozán
MGC-Ce	Metil-glikol-kitozánnal funkcionizált CeO ₂ nanorészecskék
ROS	Reaktív oxigén származékok
SOD	Szuperoxid dizmutáz enzim
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkópia
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
XPS	Röntgen fotoelektron spektroszkópia
XRD	Röntgendiffrakció

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS

2.1. Természetes antioxidánsok

Az élő szervezetben és környezetében mindig megtalálhatók nagy reakciókészségű molekulák és ionok, ezek legjelentősebb csoportját alkotják a reaktív oxigén származékok (ROS). A ROS (pl.: hidrogén-peroxid (H_2O_2), szuperoxid gyökkanion (O_2^-), hidroxilgyökök ($\cdot\text{OH}$), stb.) erős oxidálószerke, azonban kis mennyiségben több képviselőjük is fontos szerepet tölt be alapvető jelátviteli folyamatokban és a sejtek homeosztázisának fenntartásában is.¹ Az élő szervezetek számos folyamat, például az oxidatív foszforiláció során termelnek ROS-t,² a lebontásukért pedig molekuláris (pl.: glutation, E-vitamin, stb.) és enzimatis (pl. kataláz (CAT), torma peroxidáz (HRP), szuperoxid dizmutáz (SOD), stb.) antioxidánsok hálózata felel.³ A SOD kiemelkedően hatékonyan katalizálja a szuperoxidion bomlását, molekuláris oxigént és hidrogén-peroxidot eredményezve. A CAT enzim katalizálja a H_2O_2 diszproporcióját vízre és molekuláris oxigénre, míg számos peroxidáz és peroxiredoxin enzim lehetővé teszi a H_2O_2 reakcióját oxidálható szubsztátokkal, ezzel korlátozva a ROS szintjét.⁴



1. ábra: A ROS felhalmozódását elősegítő hatások, a szervezet biomolekuláit károsító mechanizmusok és az oxidatív stresszhez köthető betegségek összefoglalása.

Ezt az egyensúlyt felboríthatják külső hatások – mint például környezetszennyezés, nagy energiájú elektromágneses sugárzás és dohányzás – amelyek megnövelik a ROS koncentrációját (1. ábra).⁵ A felhalmozódott ROS képesek többek között lipideket, fehérjéket és a DNS-t káros mértékben oxidálni, amely oxidatív stresszt eredményez,⁶ ez pedig számos súlyos betegséghez köthető (pl.: cukorbetegség, rák, szív- és érrendszeri betegségek, Alzheimer-kór, stb.).⁵

Az orvosbiológiai jelentőség mellett a ROS mennyiségének korlátozása kiemelt fontosságú többek között a kozmetikai-,⁷ élelmiszer-⁸ és csomagolóiparban,⁹ azonban a természetes antioxidánsok alkalmazását komoly hátrányok is jellemzik ezeken a területeken. A kizárólag molekuláris antioxidánsok által elért reakciósebességek rendszerint több nagyságrenddel elmaradnak az enzimkatalízis eredményeitől,⁵ továbbá az enzimek katalizátorként egymást követően több szubsztrátmolekula átalakításában is képesek szerepet játszani. Az enzimatisz antioxidánsok kinyerése, tisztítása és tárolása azonban költséges és bonyolult,¹⁰ környezetük kis eltérései az optimális paraméterektől (pl.: pH, hőmérséklet, ionerősség, inhibitorok jelenléte, stb.) pedig aktivitásuk csökkenéséhez, vagy akár elvesztéséhez vezethetnek.¹¹ További hátrányuk, hogy kinyerésük számos esetben génmódosított élőlényekből történik, ezt a folyamatot azonban a nemzetközi hatóságok egyre szigorúbban szabályozzák. Széleskörű igény merült tehát fel az enzimek helyettesítésére tudományos, ipari és orvosbiológiai célokra egyaránt.

2.2. Nanozyme-ok

Természetes enzimek alternatívái lehetnek nanozyme-ok,¹² amelyek enzimek működését utánzó nanoanyagok. Az utóbbi évtized fő kutatási irányvonalát az önmagukban is katalitikus, enzimszerű aktivitással rendelkező, jellemzően szervesetlen nanorészecskék képezték.¹³ Kémiai és szerkezeti változatosságuk számottevő, képviselőik közé tartoznak többek között fém nanorészecskék (pl.: arany, ezüst, platina, stb.), fém-oxidok (pl.: Mn_3O_4 , CeO_2 , Fe_3O_4 , stb.) és fémorganikus vázszerkezetek is.^{14,15} A természetes enzimekhez képest a nanozyme-ok számos előnnyel rendelkeznek, ezek közé tartozik jellemzően egyszerű, olcsó és méretnövelhető előállításuk,¹⁶ környezetük körülményeivel szemben (pl.: pH, hőmérséklet, stb.) tanúsított nagyobb ellenállóképességük¹⁷ és finomhangolható fizikai-kémiai tulajdonságaik is.¹⁸ Biokompatibilitásuk rendszerint számottevő, így lehetséges ipari felhasználásuk mellett terápiás alkalmazásukban is komoly potenciál rejlik, valamint az orvosi képalkotás területén is kiemelkedően ígéretes anyagokként tarthatók számon.¹⁹ Szubsztrátok széles skálájának érzékeny és szelektív detektálására képesek,²⁰ az így fejlesztett szenzorok pedig enzimeket felhasználó tesztek jelentősen olcsóbb és egyszerűbben kezelhető alternatívái lehetnek.²¹

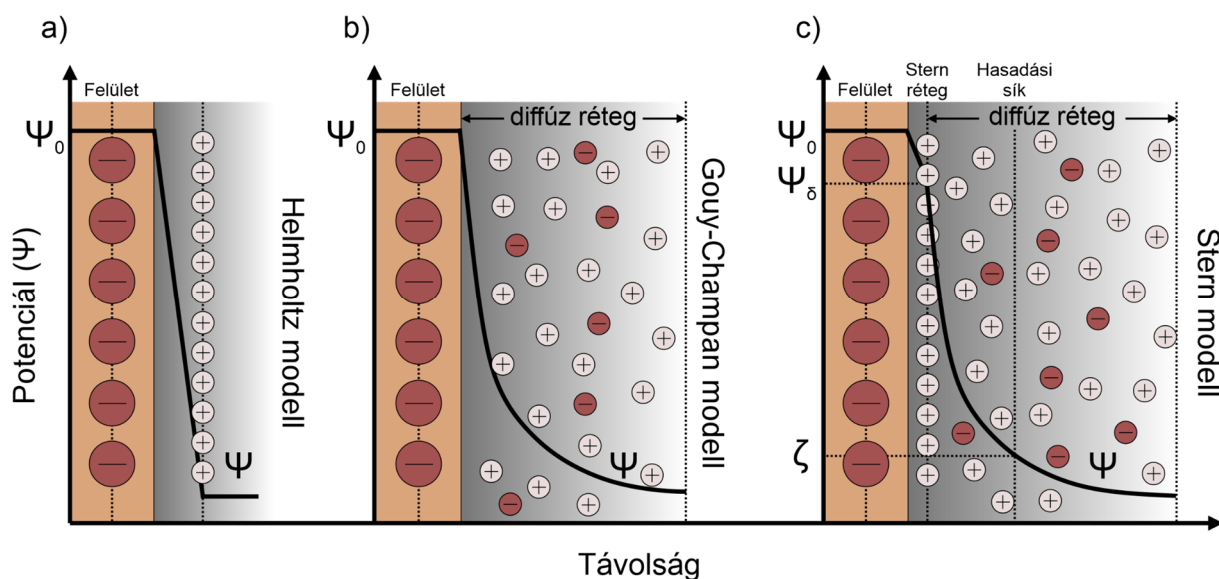
Munkánk során CeO_2 nanorészecskékre (CeNPs) fókuszáltunk. Ez a nanozyme egyike a legkorábban felfedezetteknek, 2007-ben került igazolásra SOD-szerű aktivitása.²² Az ezt követő években intenzív tudományos munka bizonyította a CeNPs kataláz, peroxidáz, oxidáz és foszfatáz enzimeket utánzó hatását is.²³ A CeNPs és számos módosított, CeNPs-en alapuló

nanozyme^{24,25} ígéretes multifunkcionális nanoanyagnak mutatkozik többek között az antioxidáns terápia,²⁶ a szenzorok²⁷ és az elektrokatalízis²⁸ területén. A CeNPs előállítása, szerkezeti jellemzése és lehetséges felhasználásainak feltárása számos publikáció tárgyát képezte a közelmúltban, viszont kolloidkémiai tulajdonságait leíró adatok (pl.: felületi töltés, hidrodinamikai méret, stb.) ritkán állnak rendelkezésre. A nanozyme-ok felhasználása a legtöbb esetben folyadék közegben történik, ezáltal diszperzióstabilitásuk rendkívül fontos paraméternek számít, ennek ellenére kolloidkémiai jellemzésük a legtöbb szakcikkben hiányos.

2.3. Kolloid rendszerek stabilitása

Molekulákhoz hasonlóan kolloid részecskék között is létrejönnek elektrosztatikus vonzáson alapuló kölcsönhatások, amelyek jellege függ a felületek polaritásától.²⁹ A dipólus-dipólus (Keesom) kölcsönhatás permanens dipólusok molekuláris szintű elektrosztatikus vonzását jellemzi. A dipólus-indukált dipólus (Debye) kölcsönhatás során egy permanens dipólus torzítja egy apoláris részecske elektronfelhőjét, ezzel lehetővé téve elektrosztatikus vonzóerő kialakulását. A pillanatnyi dipólus-indukált dipólus (London) vagy diszperziós kölcsönhatás kialakulásáért az elektronfelhő eloszlásának pillanatnyi, véletlenszerű egyenlőtlensége felelős. Az így átmenetileg kialakuló dipólus a Debye kölcsönhatáshoz hasonlóan képes dipólust indukálni, ezzel egy vonzó kölcsönhatás alakul ki. E három kölcsönhatást együttesen van der Waals kölcsönhatásoknak nevezzük. Közös jellemzőjük, hogy főként vonzó erőket alakítanak ki és nagyságuk fordítottan arányos a kölcsönhatásba lépő felületek távolságának hatodik hatványával, így a távolság csökkenésével jelentőségük drasztikusan megnövekszik.

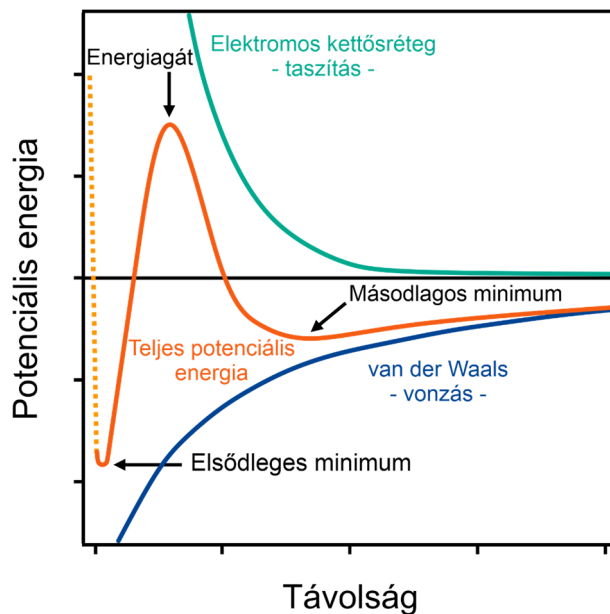
Stabil kolloid rendszerek létezéséhez szükség van taszító erők jelenlétére is, amelyek ellensúlyozzák a van der Waals erőket, ezzel minimalizálva a részecskék aggregációját. A taszítást a kolloid részecskék felületi töltése teszi lehetővé, ennek kialakulása pedig többek között felületi funkciós csoportok protonálódásához, deprotonálódásához, valamint ionok specifikus adszorpciójához, illetve oldódásához köthető.³⁰ A felületi töltés kialakít egy elektromos kettősréteget, amelyet több modell segítségével is jellemezhetünk.³¹



2. ábra: A szilárd-folyadék határfelület sematikus leírása a Helmholtz modell (a), a Gouy-Chapman modell (b) és a Stern-modell (c) alapján. Az ábrán negatív töltésű felület szerepel, így itt a pozitív töltésű ellenionok alakítják ki a felületre adszorbeálódott réteget a Helmholtz és Stern modellben. A (c) ábrán Ψ_δ a Stern rétegnél mérhető potenciál, ζ pedig a hasadási síknál mérhető zéta potenciál.

A Helmholtz modellben (2(a). ábra) a felületi töltés előjelével ellentétes töltésű ionok (ellenionok) erősen kötődnek a felülethez és egy egyenletes réteget képeznek attól adott távolságra, míg a potenciál lineárisan csökken. A Gouy-Chapman modell (2(b). ábra) diffúzrétet tekint az ionok által alkotott réteget, amelyben a potenciál a felülettől való távolság függvényében exponenciálisan csökken. A Stern modell (2(c). ábra) ötvözi az előző két modell elemeit, azaz az ellenionok egy adszorbeálódott rétege (Stern réteg) mellett diffúz réteget is számításba vesz. Ez a modell definiálja továbbá a hasadási síkot, amely határolja a részecskével a Brown-mozgás során együtt mozgó folyadékot. A hasadási síknál mérhető potenciál a zéta potenciál (ζ). A fenti meghatározó modelleknek több kiegészítése is ismert.³²

Kolloid rendszerek stabilitását jellemzi a fenti két típusú kölcsönhatást figyelembe véve a széles körben alkalmazott Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) elmélet.^{33,34} A 3. ábra két hasonló, töltött felületű nanorészecske kölcsönhatását írja le sematikusán a távolságuk függvényében.³¹



3. ábra: A DLVO elmélet alapján leírt potenciális energia két hasonló, felületi töltéssel rendelkező kolloid részecske távolságának függvényében. Az energiaprofil megalkotása során figyelembe vett kölcsönhatások a van der Waals vonzóerők és az elektromos kettősrétegek közötti elektrosztatikus taszítás. A pontozott vonal az atomok elektronfelhői közötti taszítást jelzi, amely csak nagyon kis távolságban jelentős, és a DLVO elmélet nem tartalmazza.

A részecskék nagy távolsága esetén egy gyenge, vonzó erőhatás érvényesül, amely a másodlagos minimum helyén a legjelentősebb. A részecskék távolságának további csökkenését azonban az elektromos kettősrétegek közötti erős taszító kölcsönhatások akadályozzák. Ha a részecskék ezt az energiagátat meghaladó kinetikus energiával rendelkeznek, képesek elérni az elsődleges minimumot, ahol a van der Waals erők biztosítják az őket összetartó vonzó kölcsönhatást. A nagyon kis távolságban lévő részecskék potenciális energiáját leíró pontozott vonal jelzi, hogy a részecskék nem kerülhetnek tetszőlegesen közel egymáshoz az atomok elektronfelhőinek taszítása miatt, ezzel az erőhatással azonban a DLVO elmélet nem számol.³⁵

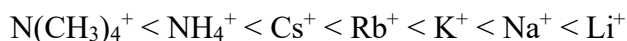
A részecskék kis távolságánál tapasztalt elsődleges energiaminimum megmutatja, hogy az aggregáció folyamata termodinamikailag kedvező, így a kolloid rendszer kinetikai stabilizálására, azaz az energiagát maximalizálására kell törekednünk, ha a célunk stabilis kolloid rendszer előállítása. A taszító kölcsönhatások elektrosztatikus eredetűek, így az energiagát nagysága elsősorban a részecskék felületi töltésétől függ: nagy felületi töltésű részecskék esetén erős taszító kölcsönhatások és stabil diszperzió várható, kis felületi töltésű részecskék között azonban gyenge taszítóerők hatnak, így ezekre a rendszerekre gyors aggregáció jellemző. Az ionerősség növekedése a felületi töltés árnyékolásán keresztül beszűkíti az elektromos kettősréteget, ezzel csökkenti annak taszító hatását, így kis ionerősségnél lassú, nagy ionerősségnél pedig gyors aggregációt tapasztalunk. A lassú és gyors

aggregációs tartományt elválasztó sókoncentrációt kritikus koaguláltató koncentrációnak (CCC) nevezzük.

A nanozyme-ok vízben diszpergálva kolloid rendszert képeznek. Enzimutánzó hatásuk mechanizmusának legfontosabb lépései rendszerint a felületükön lejátszódó redoxifolyamatok,³⁶ így a részecskék kis méretéből eredő nagy fajlagos felülete számottevő előnyt jelent. Alkalmazhatóságuk szempontjából tehát kulcsfontosságú a nanozyme részecskék között fellépő erőhatások megismerése és hangolása, valamint kolloidstabilitásuk biztosítása.

2.4. Ionspecifikus hatások

Az oldott elektrolitok kémiai minőségének hatását a klasszikus DLVO elmélet nem írja le, mivel kémiaileg inert, pontszerű töltéseként tekint az egyértékű oldott ionokra. Ezen ionok viselkedésében mutatkozó különbségek azonban jelentősek, így feltérképezésükre komoly erőfeszítések irányulnak. Az első kísérleti megfigyelés 1888-ban megállapította, hogy a különféle elektrolitalkotó ionok sorba rendezhetők fehérjék kicsapódására gyakorolt hatásuk alapján.³⁷ Már ekkor felállításra került az azóta is kiemelt tudományos érdeklődéssel övezett és többször kiegészített Hofmeister-sorozat.³⁸

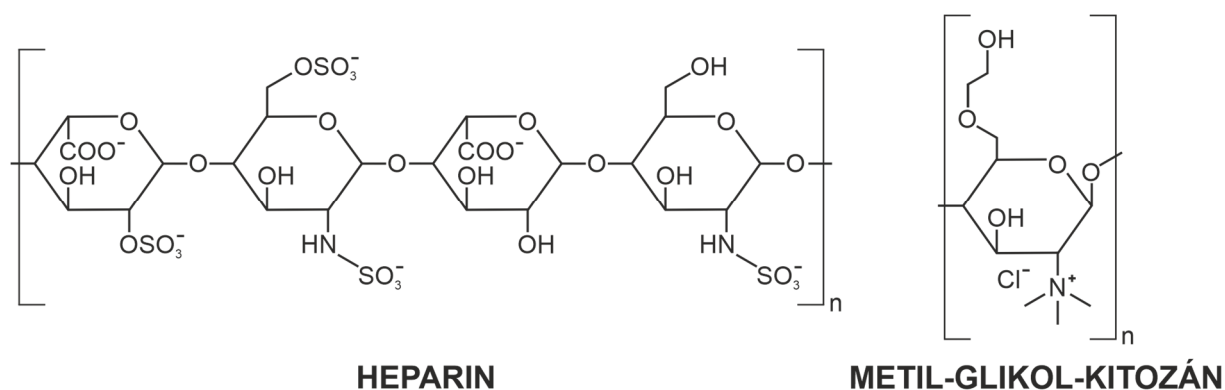


A sorozattal elsősorban az egyértékű ionok viszonyát értelmezzük, mivel a többértékű ionok jellemzéséhez – különösen a részecskeaggregáció és kolloidstabilitás leírása esetében – a Schulze-Hardy szabály használata szükséges.³⁹ Negatív felületi töltésű részecskék diszperziója stabilabb a fenti sorozat jobb oldalán helyet foglaló ionok jelenlétében, így jellemzően balról jobbra növekvő CCC értékek mérhetők. Ezt a jelenséget direkt Hofmeister-sorozatnak nevezzük. Pozitív felületi töltésű részecskék esetén azonban az indirekt Hofmeister-sorozat érvényesül: a fenti sorban jobbra haladva az ionok destabilizáló hatása egyre erősebb, így a CCC értékek ebben az irányban csökkennek.⁴⁰ Az ionok Hofmeister-sorozatban elfoglalt helye utal a méretükre és hidratációjukra is: nagy méretű, gyengén hidratált ionok az anionok sorában jobb oldalon találhatók (pl.: I^- , SCN^- , stb.), míg a kationok között bal oldalon szerepelnek (pl.: Cs^+ , $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, stb.). Ezek az ionok jól adszorbeálódnak hidrofób, gyengén hidratált felületeken, így az ellentétes felületi töltést már kis koncentrációban jelentősen csökkentik, az azonos felületi töltést azonban növelik.⁴¹ Ez kvalitatív magyarázatot ad a CCC értékek fent részletezett sorrendjére, valamint alátámasztja a hidrofíl felületek esetén tapasztalt fordított Hofmeister-sorozatot.⁴² Az ionok minőségének hatása a kolloidkémiai

tulajdonságokon kívül számos területen kulcsfontosságú. Ezek közé tartozik hidrogélek szintézise és mechanikai tulajdonságainak optimalizálása, akkumulátortechnológia fejlesztése, valamint gyógyszerhatóanyag-szállító nanoszerkezetek finomhangolása.³⁸

2.5. Nanorészecskék funkcionálizálása polielektrolitokkal

Az ionos vagy ionizálható funkciós csoportokkal rendelkező polimereket polielektrolitoknak nevezzük.⁴³ Az ionizáció következtében a polimerláncok elektromos töltéssel rendelkeznek, így képesek ellentétes töltésű felületekre adszorbeálódni, ezzel akár megváltoztatva a felületi töltés előjelét és nagyságát. Ez az adszorpció kihasználható nanorészecskék funkcionálizálására, amely képes számottevően megnövelni a kolloidstabilitást,⁴⁴ illetve nagy felületi töltést biztosítani a sókoncentráció változtatása mellett is.⁴⁵ Munkánk során a heparin (HEP) és a metil-glikol-kitozán (MGC) polielektrolitokat alkalmaztuk, amelyek korábban sikerrel stabilizáltak kolloid rendszereket,^{46,47} azonban nanozyme részecskékre még nem alkalmazták őket.



4. ábra: A heparin és a metil-glikol-kitozán polielektrolitok sematikus szerkezete. A heparin egy bonyolult, természetes poliszacharid-származék, így nem írható le pontos szerkezeti képlettel. Az ábra a heparint felépítő négy legfontosabb egységből alkotott láncot ábrázolja, a negatív töltéseket kiegyenlítő nátriumionokat pedig az áttekinthetőség érdekében elhagytuk.

A heparin természetes polielektrolit és széles körben alkalmazott vérálvadásgátló,⁴⁸ a metil-glikol-kitozán pedig a kitozán poliszacharid szintetikusán módosított származéka (4. ábra). Kiválasztásuknál fontos szempont volt az ismert biokompatibilitás, illetve a mindkét esetben várható erős adszorpció az ellentétesen töltött nanozyme részecskék felületén.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Projektünk főbb céljait az alábbiak szerint foglalhatjuk össze:

(i) CeNPs kolloidkémiai tulajdonságainak sófüggése

CeNPs felületi töltésének és kolloidstabilitásának változását követtük egyértékű sók jelenlétében. A megfelelő pH értékek beállítása után a kationok és anionok szisztematikus változtatásával terveztük a kolloidkémiai tulajdonságokat feltérképezni, majd eredményeinket a Hofmeister-sorozattal összehasonlítani diszperziódestabilizáló hatás szempontjából.

(ii) CeNPs funkcionálizálása polielektrolitokkal

Célul tűztük ki a CeNPs funkcionálizálását a felülettel ellentétes töltésű polielektrolitokkal savas és bázikus körülmények között egyaránt, majd ezt követően a funkcionálizálás stabilizáló hatásának ellenőrzését. Céljaink között szerepelt a részecskék között polielektrolitok hatására kialakuló erőhatások beazonosítása és hangolása is.

(iii) Sók és polielektrolitok hatása az enzimutánzó hatásra

Célunk volt a fentiekben vizsgált sók CeNPs-re gyakorolt hatásának tanulmányozása. Végül a polielektrolitokkal funkcionálizált CeNPs aktivitását is tesztelni kívántuk, illetve összehasonlítani a felületmódosítás előtti adatokkal. Méréseinkkel arra kerestük a választ, hogy vonható-e párhuzam az enzimutánzó hatás és kolloidstabilitás között, valamint hogy fellépnek-e további, specifikus kölcsönhatások mind stabilitás, mind pedig aktivitás szempontjából.

Összességében a tudományos munka fő célja olyan CeNPs-en alapuló nanozyme diszperziók előállítása volt, amelyek megfelelő szerkezeti és kolloidstabilitással bírnak, illetve jelentős peroxidáz-szerű aktivitást mutatnak.

4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. Felhasznált eszközök

- Anton Paar LitesizerTM 500 fényszórásmérő
- ALV/CGS-3 kompakt goniométer
- Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis spektrofotométer
- Grant Instruments, PTR-60 multifunkciós keverőlap
- Elmasonic P ultrahangos tisztító kád
- WTW inoLab® pH 7310 pH-mérő

4.2. Felhasznált anyagok

A $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99,5%) sót az Acros OrganicsTM-től szereztük be. Etilén glikolt (99,5%, AnalaR NORMAPUR), ammóniát (25%, AnalaR NORMAPUR), etanolt (abszolút etanol, AnalaR NORMAPUR), dimetil-szulfoxidot (DMSO, $\leq 0,03\%$ H_2O , analitikai reagens), hidrogén-peroxidot (30% m/m, AnalaR NORMAPUR), nátrium-hidroxidot (AnalaR NORMAPUR), sósavat (37% m/m, AnalaR NORMAPUR), valamint NaCl (GPR RECTAPUR), KCl (AnalaR NORMAPUR) és CsCl (Ultra Pure) sókat a VWRTM-től rendeltünk. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidint ($\geq 99\%$), heparint (heparin nátriumsó sertésbélnyálkahártyából, Grade 1-A, ≥ 180 USP egység/mg, BioReagent), metil-glikol-kitozánt ($\geq 70\%$), valamint KNO_3 ($\geq 99,0\%$, ACS Reagent) és KSCN ($\geq 99,0\%$, ReagentPlus) sókat a Sigma-Aldrich-től szereztünk be.

A fenti vegyszerek további tisztítás nélkül kerültek felhasználásra. A kísérletekhez felhasznált vizet Adrona B30 víztisztító rendszerrel ionmentesítettük, majd Millex® VV szűrő (0,1 μm , Durapore® PVDF membrán) segítségével eltávolítottuk a szennyező szilárd részecskéket. Az eszközöket használat előtt Hellmanex® III koncentrátummal tisztítottuk a forgalmazó által javasolt hígításban. Munkánk során a legfontosabb kísérleti körülmények közé tartozott a diszperzió pH értéke, azonban pufferoldatok használatát mellőznünk kellett, hiszen ezek nagy mennyiségű oldott iont juttattak volna a mintába, ezzel lehetetlenné téve a vizsgálni kívánt ionok hatásának pontos meghatározását. Ehelyett a tisztított vízhez, valamint minden vizes törzsoldathoz és törzsdiszperzióhoz 1 M HCl-, illetve 1 M NaOH-oldatot adagoltunk, miközben pH-mérő segítségével erősítettük meg a pH = 4, illetve pH = 10 értékek elérését. Az így beállított oldatokat használtuk minták elkészítéséhez.

4.3. A CeO₂ nanorészecskék előállítása

A CeNPs-et egy korábban leírt módszerrel állítottuk elő.⁴⁹ Főzőpohárban feloldottunk 92 mL vízben 5,16 g Ce(NO₃)₃ · 6H₂O sót, hozzáadtunk 7,8 mL etilén glikolt, majd 25% NH₃ segítségével az oldat pH-ját 9,6-re állítottuk. A reakcióelegyet 50°C hőmérsékleten kevertük egy órán keresztül, majd a kivált csapadékot centrifugálással összegyűjtöttük. Ezt felváltva mostuk etanollal és vízzel három-három alkalommal, majd szobahőmérsékleten szárítottuk. A kapott szilárd anyag megfelelő mennyiségét vízben diszpergáltuk mechanikai hatás és ultrahang segítségével, ezzel 5 g l⁻¹ koncentrációjú törzsdiszperziót kaptunk.

4.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A projekt során előállított nanorészecskékről transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) segítségével készítettünk felvételeket. Ehhez JEOL JEM-1400Plus transzmissziós elektronmikroszkópot használtunk 120 kV gyorsítófeszültséget alkalmazva. A vizsgálandó részecskék 100 mg l⁻¹ koncentrációjú törzsdiszperziójának kis részletét felvittük szénréteges Formvar hártáival bevont rézből készült gridre (200 mesh). Az oldószert szobahőmérsékleten elpárologtattuk, ezzel a diszperziókban lévő részecskék lerakódtak a grid felületére, majd az így előkészített mintát mértük.

4.5. Dinamikus fényszórásmérés

Dinamikus fényszórásmérés (DLS) során a szórt fény intenzitását követjük nyomon. A fényszórást előidéző részecskék a diszperzióban folyamatos, véletlenszerű mozgást (Brown-mozgást) végeznek, így a mért intenzitás időben fluktuál. A kisebb részecskék mozgása gyorsabb, ez pedig a szórt fény intenzitásának sűrűbb fluktuációját okozza, mint nagyobb részecskék esetén.⁵⁰ Ezt a jelenséget a szórt fény intenzitás autokorrelációjával számszerűsíthetjük. Ehhez definiálható a normalizált másodrendű autokorrelációs függvény ($g^{(2)}(t)$):

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (1)$$

ahol $I(t)$ a szórt fény intenzitása egy tetszőleges t időpontban, és $I(t + \tau)$ a szórt fény intenzitása τ idővel később. Belátható, hogy tökéletes korreláció esetén, ha $\tau = 0$, akkor az (1) egyenlet számlálója $\langle I(t)^2 \rangle$, ekkor $g^{(2)}(\tau)$ értéke maximális. Ha pedig $\tau \rightarrow \infty$, akkor a két időpontban mért intenzitás között a korreláció megszűnik, az (1) egyenlet számlálója $\langle I(t) \rangle^2$

alakban írható fel, így $g^{(2)}(\tau) \rightarrow 1$. Gömb alakú, Brown-mozgást végző részecskék esetén a $g^{(2)}(\tau)$ függvény exponenciálisan csökken a (2) egyenlet alapján:⁵¹

$$g^{(2)}(\tau) = Ae^{-2\gamma\tau} + B \quad (2)$$

ahol γ a csökkenés sebessége, az A paraméter megadja a függvény amplitúdóját, a B paraméter pedig az alapvonalat, amelyhez a függvényértékek nagy τ esetén közelítenek. A γ segítségével a részecskék diffúziós együtthatója (D) kiszámítható:

$$D = \frac{\gamma}{q^2} \quad (3)$$

ahol q a szórási vektor, amely a mérés körülményeitől függ:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (4)$$

ahol n a közeg törésmutatója, λ a fényforrás hullámhossza, a szórt fényt pedig θ szögben detektáljuk. A kiszámított D értékből a Stokes-Einstein egyenlet (5) segítségével következtethetünk a részecskék hidrodinamikai sugarára (R_h):

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (5)$$

ahol k_B a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet és η a közeg dinamikai viszkozitása. A hidrodinamikai sugár különbözik a részecskék valós sugarától, mert annak a folyadékrétegnek a vastagságát is tartalmazza, amely a részecskékkel a Brown-mozgás során együtt mozog. A nem gömb alakú részecskék méretét ez a módszer a velük azonosan viselkedő gömbök sugarával közelíti.

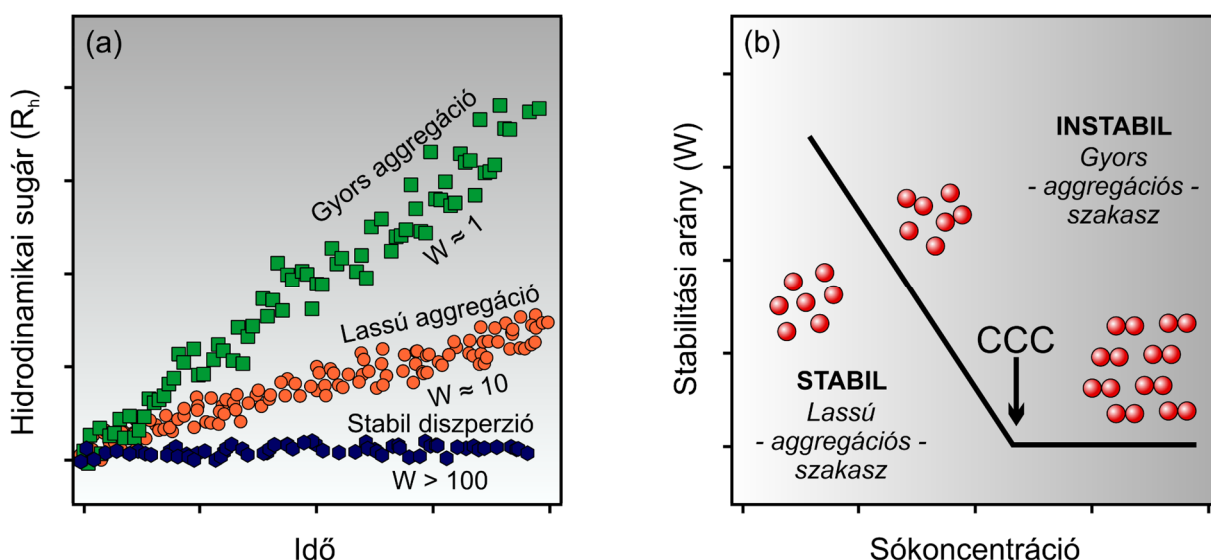
A kolloid rendszerek stabilitását jellemzi az aggregáció kinetikája, azaz a hidrodinamikai sugár időbeli változása. A látszólagos aggregációs sebességi állandó (k_{app}) az alábbi egyenlet szerint számítható:⁵²

$$k_{app} = \frac{1}{R_h(0)} \cdot \frac{dR_h(t)}{dt} \quad (6)$$

ahol $R_h(0)$ a kiindulási részecskék átlagos hidrodinamikai sugara, $\frac{dR_h(t)}{dt}$ pedig a mért R_h – t függvény meredeksége. A kolloidstabilitás jellemzésére definiálható továbbá a stabilitási arány (W):

$$W = \frac{k_{gyors}}{k_{app}} \quad (7)$$

ahol k_{gyors} a gyors aggregációs szakaszt jellemző átlagos látszólagos aggregációs sebességi állandó. A k_{app} értéke ezen a szakaszon maximális, így itt 1 körüli W értékek mérhetők, míg a magas stabilitási arány lassú aggregációt, stabil kolloid rendszert jelez. Egy tipikus DLS mérés eredményét sematikususan összefoglaltuk az 5. ábrán.



5. ábra: (a) A hidrodinamikai sugár időfüggésének sematikus bemutatása különböző kolloidstabilitással rendelkező mintákban. (b) A (7) és (8) egyenletek segítségével számolt stabilitási arány értékek tendenciája egy tipikus mérésben. A (b) ábra mindkét tengelye logaritmikusnak tekintendő, a CCC a kritikus koaguláltató koncentrációt jelöli. A piros gömbök a részecskék aggregációs állapotát szemléltetik: a gyors aggregációs szakaszban az aggregáció korai szakaszára jellemző dimereket ábrázoltuk.

Az 5(b). ábrának megfelelő adatsort a (8) egyenlet segítségével illesztettük, és nemlineáris paraméterbecsléssel határoztuk meg a gyors aggregációs szakasz eléréséhez szükséges minimális sókoncentrációt, a kritikus koaguláltató koncentrációt (CCC):⁵³

$$W = 1 + \left(\frac{CCC}{c} \right)^{-\beta} \quad (8)$$

ahol c az oldott só koncentrációja, β pedig a lassú aggregációs szakasz meredeksége. Kis CCC értékekkel jellemezhető rendszerek már kis sókoncentrációnál alacsony stabilitású

diszperziót képeznek, míg a nagy CCC értékek jelentős kolloidstabilitásra utalnak akár nagy ionerősség mellett is.

A méréseket ALV/CGS-3 kompakt goniométer rendszerrel végeztük, a hélium-neon lézer hullámhossza 632,8 nm volt, a minták hőmérsékletét a mérés ideje alatt állandó $25,0 \pm 0,2$ °C értéken tartottuk, a szórt fényt pedig 90°-os szögben detektáltuk. A minták térfogata 2 mL volt, a mérést boroszilikát üveg küvetákban (Kimble Chase) végeztük. A nanozyme végső koncentrációja a mintákban mindig 10 mg l^{-1} volt. A vizsgált nanorészecskék hozzáadása után a mintát homogenizáltuk, majd a lehető leghamarabb megkezdjük a mérést. Az aggregáció időfüggésének vizsgálata érdekében minden mérés 100 – egyenként 20 s adatgyűjtést igénylő – ismétlésből állt.

4.6. Elektroforetikus fényszórásmérés

Az elektroforetikus fényszórásmérés (ELS) során külső elektromos térbe helyezzük a vizsgált részecskék diszperzióját. A részecskék által szórt fény fázisában bekövetkező változás alapján meghatározható a részecskék sebessége. Az elektroforetikus mobilitás (EPM) kapcsolatot teremt a részecske sebessége (v) és az elektromos térerősség (E) között:³²

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (9)$$

ahol μ az elektroforetikus mobilitást jelöli. Ennek mértékegysége a (9) egyenlet alapján $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, amely a sebesség [m s^{-1}] és az elektromos térerősség [V m^{-1}] hányadosaként kapható. A gyakorlatban azonban egy tipikus mérés paramétereire az v [$\mu\text{m s}^{-1}$], illetve E [V cm^{-1}] dimenziók illenek leginkább, így az EPM-t $\mu\text{m cm V}^{-1} \text{s}^{-1}$, azaz $10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ egységekben fejezzük ki.

Az elektromos tér elektrosztatikus eredetű hatása miatt az EPM értéke információt nyújt a vizsgált részecskék felületi töltéséről. Kísérletes vizsgálatok nemrég megállapították, hogy az EPM értéke nem függ jelentősen az aggregáció mértékétől,⁵⁴ így összehasonlíthatók különböző kolloidstabilitású rendszerek EPM értékei, továbbá nem kell figyelembe vennünk a mért érték esetleges változását a mérés ideje alatt.

A méréseket Anton Paar LitesizerTM 500 fényszórásmérő készülékkel végeztük, a lézer hullámhossza 658 nm volt, a minták hőmérsékletét a mérés ideje alatt állandó $25,0 \pm 0,2$ °C értéken tartottuk. A felhasznált feszültség maximális értéke 200 V volt, nagy sókoncentrációknál azonban – az elektromos vezetőképesség növekedése miatt – ennek automatikus csökkentésére került sor. A minták térfogata megegyezett a felhasznált Anton

PaarTM Omega kűvetta térfogatával (750 μ L), a vizsgált nanorészecskék koncentrációja 10 mg l^{-1} volt. Minden minta vizsgálata során 5, egyenként 100 ismétlésből álló, egymás után elvégzett mérés átlagát vettük figyelembe.

4.7. UV-látható spektrofotometria

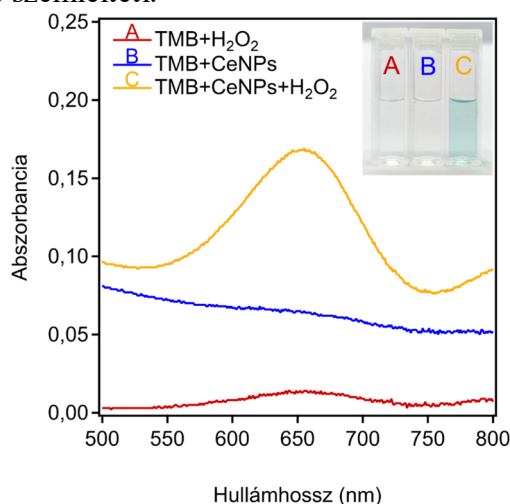
A méréseket Thermo Scientific Genesys 10S UV-látható spektrofotométer, valamint poli(metil-metakrilát) kűveták (VWR®) felhasználásával végeztük. A mért abszorbancia (A) értékekből a Lambert-Beer törvény (10) segítségével következtettünk a színyanyag koncentrációjára:

$$A = \epsilon lc \quad (10)$$

ahol ϵ a moláris extinkciós együttható, c az adott komponens koncentrációja, l pedig az optikai úthossz, amely az általunk alkalmazott körülmények között mindig 1,0 cm volt.

4.8. Peroxidáz teszt

A peroxidáz enzimek az élő szervezetben a H_2O_2 és különböző oxidálható szubsztrátok reakcióját katalizálják, ezzel csökkentve a H_2O_2 koncentrációját. A teszt segítségével a H_2O_2 és a TMB szubsztrát között lejátszódó reakciót vizsgáljuk, amely ezt a folyamatot modellezi. A TMB oxidációjához savas körülmények szükségesek, azonban a reakció katalizátor hiányában ekkor is lassú. Peroxidáz-utánzó nanozyme jelenlétében kék szín megjelenését tapasztaljuk, amely a TMB oxidációjával keletkező terméknek tulajdonítható.⁵⁵ A színváltozás UV-látható spektrofotometriával számszerűsíthető, mértéke pedig utal a nanozyme hatékonyságára. A módszer lényegét a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra: A peroxidáz teszt bemutatása UV-látható spektrumok segítségével. A minták komponenseinek koncentrációi: (A) 1 mM TMB, 5 mM H_2O_2 ; (B) 1 mM TMB, 20 mg l^{-1} CeNPs; (C) 1 mM TMB, 20 mg l^{-1} CeNPs, 5 mM H_2O_2 . Minden minta pH értéke 4 volt, a mérésekre 10 perc reakcióidő után került sor. Az ábrán a mérés után készült fénykép is látható a mintákról.

A kék szín megjelenését kizárólag abban a mintában tapasztaltuk, amely a peroxidáz teszt mindhárom fő komponensét tartalmazta (C). Ez alapján kijelenthető, hogy a kísérletünk körülményei között a katalizátor nélküli reakció (A), illetve a TMB oxidációja H_2O_2 nélkül, a CeNPs oxidáz-utánzó aktivitásán keresztül (B), nem játszódik le mérhetően. A (B) spektrum abszorbancia értékei a CeNPs fényszórásának tulajdoníthatók, a minta fényelnyelést mutat a teljes vizsgálható hullámhossz-tartományon.

A mérések során 2000 μl térfogatú mintákat készítettünk. Minden vizes törzsoldatot pH 4-re állítottunk 1 M HCl segítségével. A TMB szubsztrátot rossz vízoldhatósága miatt DMSO-ban oldottuk fel. Az enzimutánzó aktivitás vizsgálatakor a CeNPs koncentrációja 20 mg l^{-1} volt, míg a kontrollkísérletek során a CeNPs törzsdiszperziója helyett azzal megegyező térfogatú oldószert (pH 4-es HCl-oldatot) adtunk a mintákhoz, ezzel biztosítva az állandó össztérfogatot. A mintákban a H_2O_2 koncentrációját állandó 5 mM értéken tartottuk, míg a TMB koncentrációját 0,1 mM és 1 mM között egyenletesen változtattuk. A H_2O_2 törzsoldat bemérésével elindítottuk a reakciót, majd az abszorbanciát 10 percen keresztül rögzítettük 652 nm hullámhosszon. A kék színű termék koncentrációját a mért abszorbancia értékekből a Lambert-Beer törvény (10) segítségével számítottuk ki az $l = 1 \text{ cm}$ és $\epsilon = 39\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ adatok alapján.⁵⁶ A kapott koncentráció-idő grafikon meredeksége megadja a reakció kezdeti sebességét (v), amelyet a TMB koncentráció függvényében ábrázoltunk. Az adatpontokat a Michaelis-Menten modell alapján illesztettük, és nemlineáris paraméterbecsléssel határoztuk meg a Michaelis-Menten egyenlet (11) paramétereit:

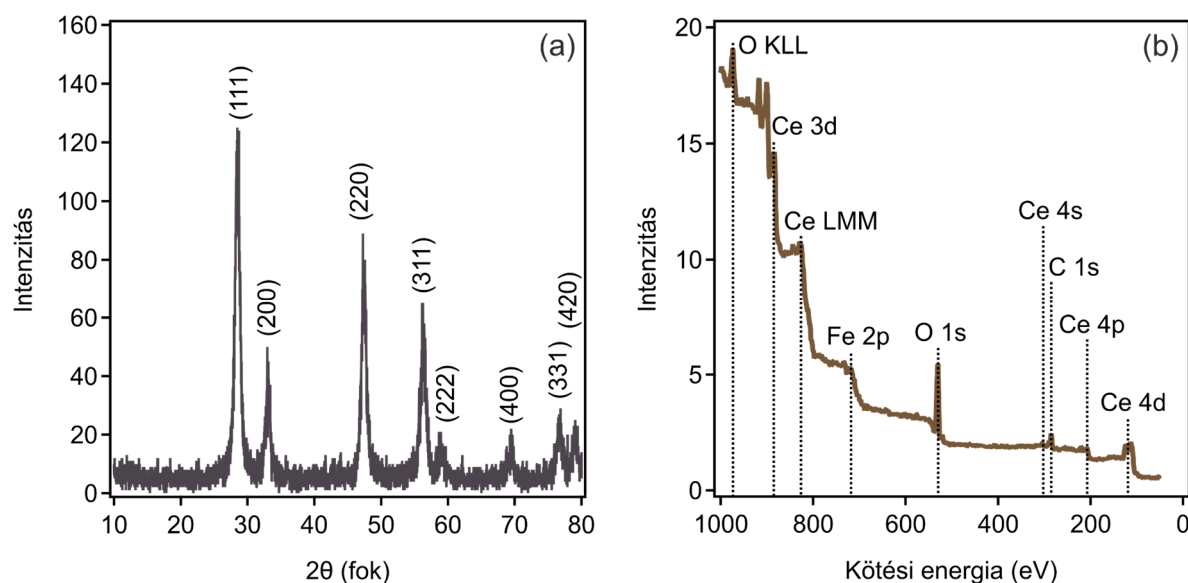
$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

ahol $[S]$ a TMB szubsztrát koncentrációja, $v_{\max}$ a reakciósebesség legnagyobb elérhető értéke, K_M pedig a Michaelis-Menten állandó. A K_M megadja a $v_{\max}$ felének eléréséhez szükséges szubsztrátkoncentrációt. Minél kisebb a K_M érték, annál nagyobbak tekinthető a szubsztrát affinitása a katalizátor felületéhez.

5. EREDMÉNYEK

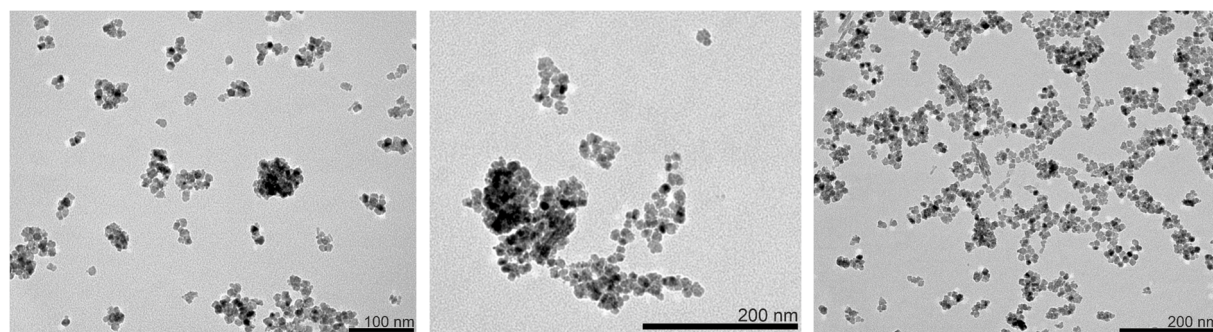
5.1. A CeNPs karakterizálása

Az előállított CeNPs széles körű karakterizálását kutatócsoportunk korábbi munkája során elvégeztük.²⁴ A 7. ábrán ennek a munkának egy részlete, a röntgendiffrakció (XRD), illetve a röntgen fotoelektron spektroszkópia (XPS) mérések eredményei láthatók.



7. ábra: A szintetizált CeNPs XRD (a) és XPS (b) spektruma. Az O KLL és Ce LMM csúcsok az O és Ce atomok megfelelő Auger átmeneteiből származnak, a vas jelenléte pedig a használt mintatartónak tulajdonítható. Az ábra alapját kutatócsoportunk korábbi tanulmánya²⁴ képezi.

Az XRD és XPS spektrumok is megerősítették a CeNPs sikeres szintézisét, a detektált csúcsok jó egyezést mutattak a szakirodalomban korábban leírt mérési eredményekkel.^{49,57} A CeNPs morfológiáját tovább vizsgáltuk TEM segítségével, amely során a diszperziók beszáritásra kerültek a mintatartón.



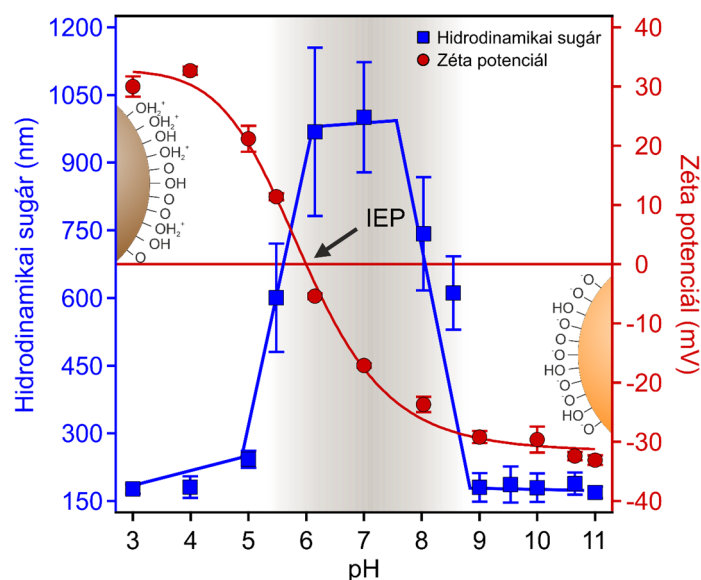
8. ábra: TEM felvételek az előállított CeO₂ nanorészecskékről.

A TEM felvételeken (8. ábra) látható, hogy a CeNPs igen kis részecskékből állnak, amelyek többsége azonban változatos méretű és alakú aggregátumokba rendeződik. A korábban bemutatott fényszóráson alapuló technikák segítségével ezeknek az aggregátumoknak a

tulajdonságait mérjük kolloid diszperziókban. A nagyobb méretű klaszterek a TEM mérés előtt történő szárítási folyamatban keletkeztek.

További munkánkhoz elengedhetetlen a CeNPs kolloidkémiai tulajdonságainak ismerete különböző pH értékek mellett. Ennek vizsgálatához meghatároztuk a CeNPs elektroforetikus mobilitását: a mért érték savas közegben (pH 4) $2,87 \pm 0,12 (\times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$, bázikus közegben (pH 10) pedig $-2,70 \pm 0,04 (\times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$ volt. Az EPM értékek utalnak a részecskék felületi töltésére, így eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a CeNPs pH 4-en pozitív, míg pH 10-en negatív előjelű felületi töltéssel rendelkeznek, amely alapvetően befolyásolja kolloidkémiai viselkedésüket. Mindkét mért EPM érték nagyságrendje kellően nagy számításához, hogy – a DLVO elmélettel összhangban – az elektromos kettősrétegek közötti taszítás határozza meg a részecskék kölcsönhatását, így pH 4 és pH 10 mellett is stabil diszperzióra számíthatunk. Ezt a hidrodinamikai sugár értékek is megerősítik: savas közegben (pH 4) $191 \pm 47 \text{ nm}$, míg bázikus közegben (pH 10) $151 \pm 23 \text{ nm}$ mérhető. Mindezek ismeretében további vizsgálatainkat mindkét pH értékre kiterjesztettük, így lehetőségünk nyílt pozitív és negatív töltésű CeNPs kolloidkémiai viselkedésének széles körű megismerésére különböző oldott sók jelenlétében.

A fenti eredmények jó egyezést mutattak kutatócsoportunkban korábban mért adatokkal, amelynek összefoglalása a 9. ábrán látható.



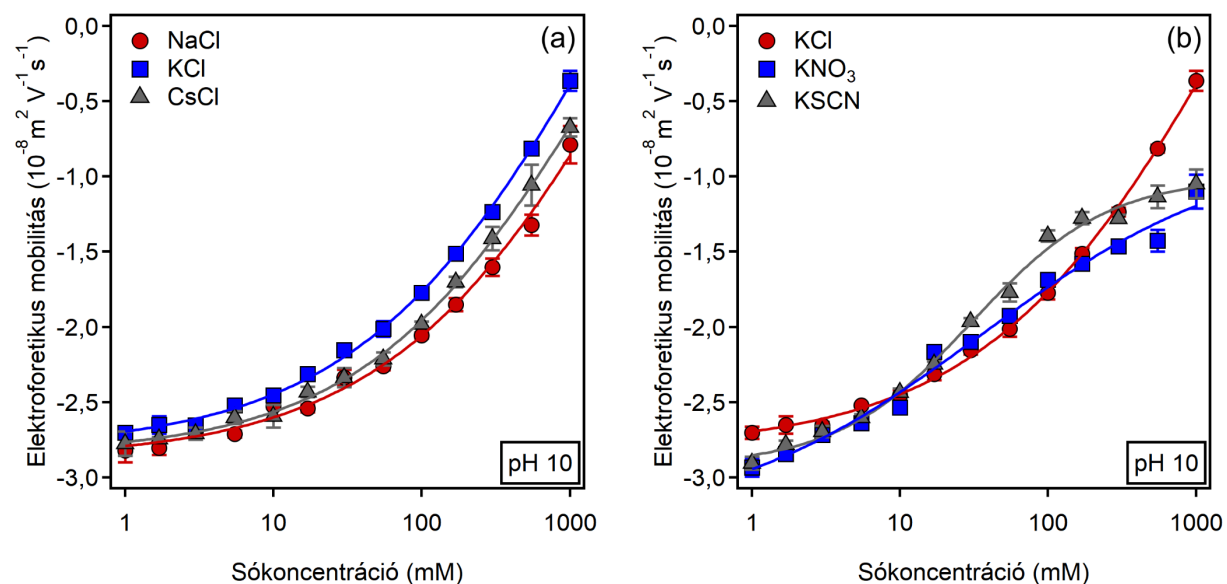
9. ábra: A CeNPs zéta potenciáljai és hidrodinamikai sugarai a pH függvényében. A CeNPs koncentrációja 50 mg l^{-1} volt, a háttér elektrolitkoncentrációt 1 mM NaCl biztosította. Az izoelektromos pontot ($\zeta = 0 \text{ mV}$) az IEP rövidítés jelöli, az instabil diszperzióhoz tartozó pH-tartományt pedig a sötétített régió jelzi. A folytonos görbék célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése. Az ábra alapját kutatócsoportunk korábbi tanulmánya²⁴ képezi.

A zéta potenciál és az általunk jelen dolgozatban használt EPM értékek egyenesen arányosnak tekinthetők a Helmholtz-Smoluchowski egyenlet alapján.³² A savas közegben tapasztalt pozitív felületi töltés a felületi hidroxilcsoportok protonálódásának tulajdonítható, míg a bázikus közegre jellemző negatív felületi töltést a felületi hidroxilcsoportok deprotonálódása okozza.²⁴ Az IEP (pH 6) környékén a kis zéta potenciál értékek nagy hidrodinamikai sugarakkal párosulnak, ebben a tartományban instabil kolloid rendszer jellemző. A jelenség értelmezhető a DLVO elmélet alapján, hiszen kis felületi töltés mellett csak gyenge tasztítóerők lépnek fel az elektromos kettősrétegek között, így a részecskék kölcsönhatását a vonzó van der Waals erők határozzák meg, aggregációt és nagy hidrodinamikai sugarat eredményezve.

5.2. Kolloidkémiai tulajdonságok vizsgálata oldott sók jelenlétében

5.2.1. Kolloidstabilitás bázikus közegben

Elsőként bázikus körülmények között (pH 10) tanulmányoztuk ELS segítségével a CeNPs elektroforetikus mobilitását különböző kationok és anionok jelenlétében. A méréssorozatokhoz rendre a vizsgálandó kationok kloridját, illetve az anionok káliumsóját használtuk (10. ábra).

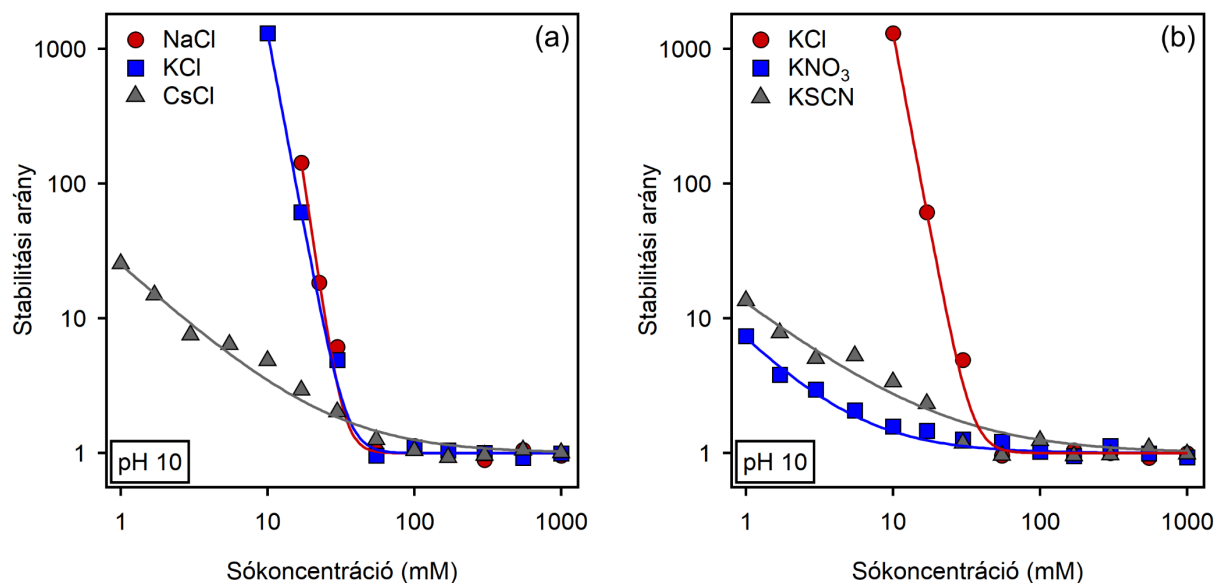


10. ábra: A CeNPs EPM értékei a sókoncentráció függvényében az oldott kationok (a), illetve anionok (b) változtatása mellett, bázikus körülmények között (pH 10). A folytonos görbék célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése.

Méréseink megerősítették a korábban tapasztalt nagy abszolútértékű, negatív EPM értéket alacsony ionerősségeknél. Minden vizsgált só koncentrációjának növelése csökkentette az EPM-t, ami a felületi töltés árnyékolásának tulajdonítható. A vizsgált

koncentrációtartományban egyik só jelenlétében sem érte el a CeNPs az IEP-t, valamint nem következett be a felületi töltés előjelének megváltozása (áttöltés) sem. Az egyes sók EPM-ra gyakorolt hatásában nem mutatható ki jelentős különbség, mindegyik ezt az általános tendenciát követi.

A fenti kationok és anionok kolloidstabilitásra gyakorolt hatását DLS segítségével tanulmányoztuk ugyanolyan kísérleti körülmények között, mint a fenti ELS mérések során (11. ábra).

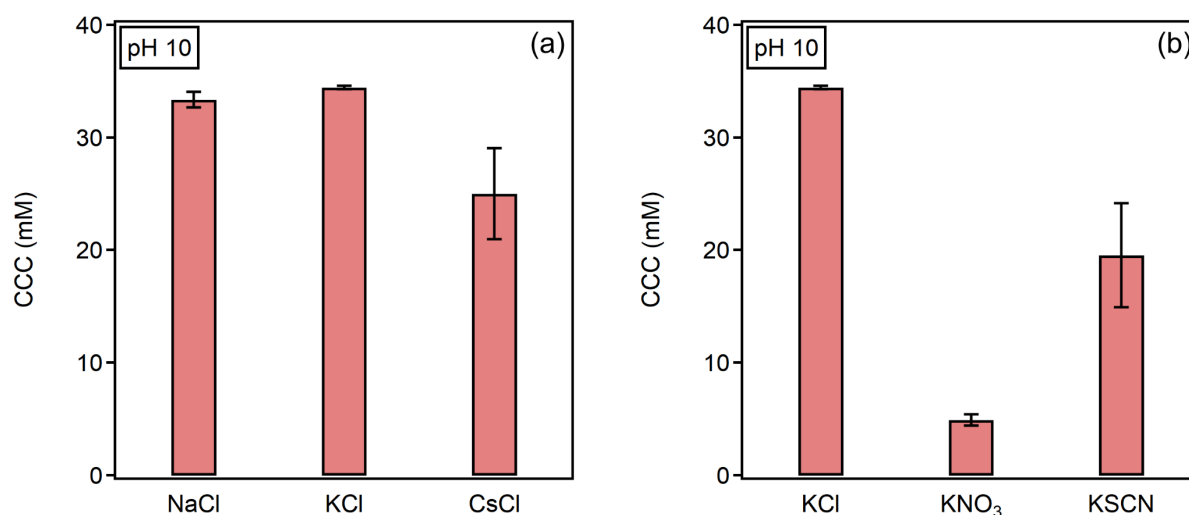


11. ábra: A CeNPs stabilitási arány értékei a sókoncentráció függvényében az oldott kationok (a), illetve anionok (b) változtatása mellett, bázikus körülmények között (pH 10). Az adatpontokat a (8) egyenlettel illesztettük, ezt a folytonos görbék illusztrálják.

A sókoncentráció növelésének hatására az aggregáció sebessége minden rendszernél növekedett, amelyet csökkenő stabilitási arány értékek jeleznek a (7) egyenlet alapján. Az eredményeink rámutatnak, hogy a diszperziók destabilizációja a DLVO elmélettel értelmezhető. Növekvő sókoncentráció hatására az EPM értékek közelebb kerülnek 0-hoz, amely összefügg az elektromos kettősrétegek közötti taszítás gyengülésével. Így a vonzó van der Waals erők válnak a részecskék közötti domináns kölcsönhatássá, egyre gyorsabb aggregációt eredményezve. Kellően nagy sókoncentráció olyan mértékben lecsökkenti az elektromos kettősrétegek taszításából származó energiagátat (3. ábra), hogy az aggregáció sebességét elsősorban a diffúzió sebessége határozza meg. Ekkor éri el a rendszer az aggregáció sebességének maximumát, amelyet állandó, 1 körüli stabilitási arány értékekkel jellemezhetünk. Ha a DLVO elmélet által megjósolt aggregációs mechanizmus mellett más típusú kölcsönhatások is jelen lennének,⁵⁸ akkor a gyors aggregációs szakaszban 1-nél kisebb vagy nagyobb stabilitási arány értékeket mérnénk.

A DLVO elmélet nem tesz különbséget a különböző anyagi minőségű egyértékű sók között a kolloidstabilitásra gyakorolt hatásuk alapján, a 11. ábra eredményei azonban mégis számottevő eltéréseket mutatnak. A vizsgált koncentrációtartományban csak NaCl és KCl jelenlétében volt stabil kolloid rendszer megfigyelhető, kis sókoncentrációk esetén. Ellenben CsCl, KNO₃ és KSCN jelenlétében még 1 mM oldott sókoncentráció mellett is csak korlátozott stabilitás jellemezte a CeNPs diszperziót. Ez arra utal, hogy bázikus közegben a CeNPs alkalmazhatósága szempontjából kiemelt tényezőnek számít a Cs⁺, NO₃⁻, illetve SCN⁻ ionok jelenléte, szélsőséges destabilizáló hatásuk miatt.

A 11. ábra adatsorait illesztettük a (8) egyenlettel,⁵³ ezzel meghatároztuk az egyes rendszerekre jellemző CCC értékeket.

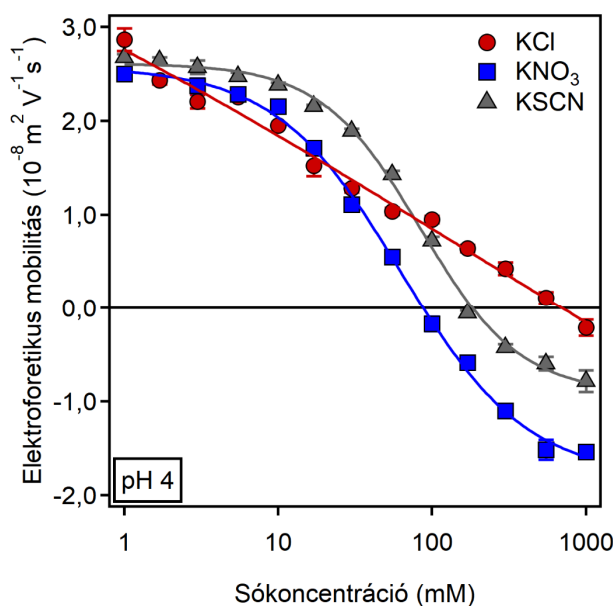


12. ábra: A CeNPs CCC értékei az oldott kationok (a), illetve anionok (b) változtatása mellett, bázikus körülmények között (pH 10). Az ábrán a 11. ábra adatsorainak illesztésével kapott CCC értékek szerepelnek, a (8) egyenlet alapján.

A 12(a). ábra CCC értékei megerősítik a 11(a). ábrán szereplő tendenciákat: a NaCl és KCl sók nagyon hasonlóan befolyásolták a CeNPs kolloidstabilitását, míg a CsCl destabilizáló hatása erősebb volt, amelyet kisebb CCC érték jelez. Ez kvalitatív egyezést mutat a direkt Hofmeister-sorozattal,⁴¹ a destabilizáló hatás a Na⁺ ≈ K⁺ < Cs⁺ sorrendet követi. Az anionok (11(b). és 12(b). ábra) a CeNPs diszperzió stabilitását Cl⁻ < SCN⁻ < NO₃⁻ sorrendben csökkentik, így viszonyuk nem értelmezhető a Hofmeister-sorozat segítségével. Az eltérés a nitrátionok nem szokványos viselkedésére utal a határfelületen, amely aggregációt okoz már kis koncentrációknál is. A szokatlan CeNPs – NO₃⁻ kölcsönhatás tisztázására további vizsgálatok szükségesek egy későbbi projekt során.

5.2.2. Kolloidstabilitás savas közegben

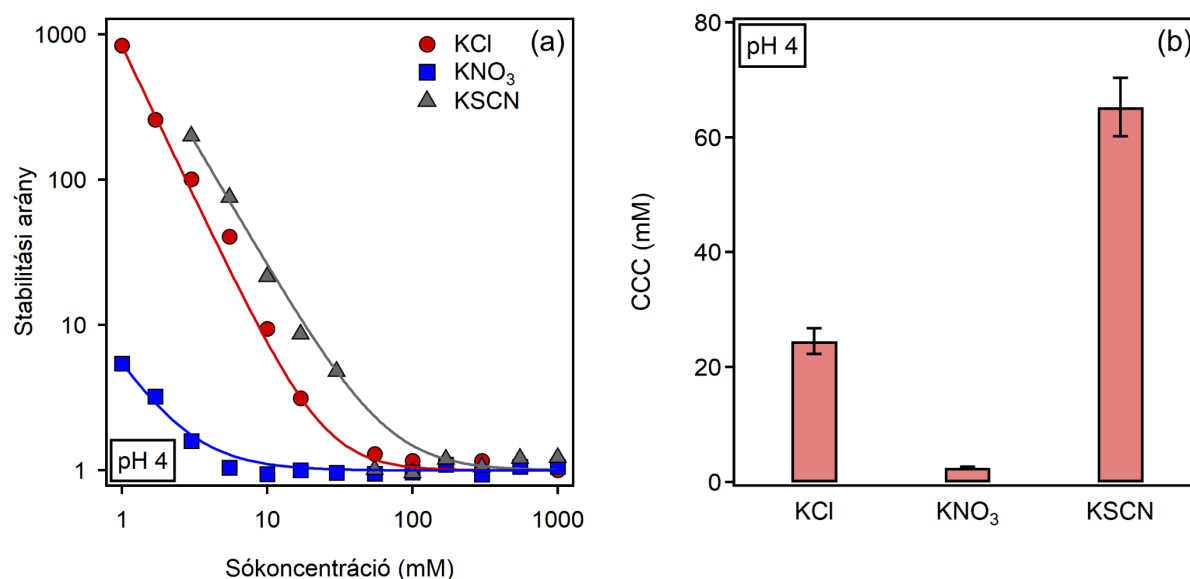
A kolloidkémiai tulajdonságokat savas közegben (pH 4) is feltérképeztük. Korábban megállapítottuk, hogy alacsony pH érték mellett a CeNPs felületi töltése pozitív előjelű (9. ábra). Savas közegben végzett méréseink során tehát a felülettel ellentétes töltésű anionok vizsgálatára fókuszáltunk, hiszen az ellenionok minőségének hatása a nanorészecskék kolloidkémiai tulajdonságaira legtöbbször erősebb az azonos töltésű mellékionok hatásánál.⁴¹ A korábban is használt sók jelenlétében mért EPM értékek a 13. ábrán láthatók.



13. ábra: A CeNPs EPM értékei a sókoncentráció függvényében az anionok változtatása mellett, savas körülmények között (pH 4). A folytonos görbék célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése.

Kis sókoncentrációnál a CeNPs diszperziót mindhárom esetben jelentősen pozitív EPM értékek jellemezték, összhangban eddigi eredményeinkkel. A sókoncentráció növelése a felületi töltés árnyékolásán keresztül csökkentette az EPM értékeket, azonban eltérő mértékben. A KNO₃ és KSCN sók nagy koncentrációja mellett a két anion adszorpciója egyértelműen megváltoztatta a felületi töltés előjelét. Az áttöltött részecskék EPM értéke a vizsgált tartományon nem érte el a kiindulási EPM abszolútértékét, ami mérsékelt áttöltést és adszorpciót jelez.

Az anionok kolloidstabilitásra gyakorolt hatását DLS segítségével vizsgáltuk, amely során stabilitási állandó értékeket határoztunk meg hasonló kísérleti körülmények között, mint az ELS mérések esetében.



14. ábra: (a) A CeNPs stabilitási arány értékei a sókoncentráció függvényében az oldott anionok változtatása mellett, savas körülmények között (pH 4). Az adatpontokat a (8) egyenlettel illesztettük, az így meghatározott CCC értékek a (b) ábrán láthatók.

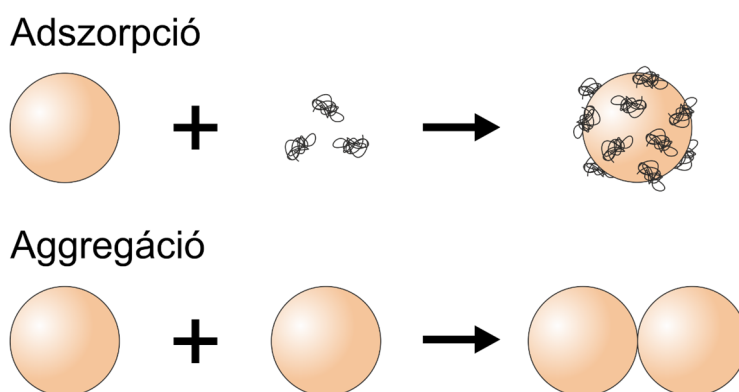
Eredményeink a 11. ábrával kapcsolatban tárgyalt általános tendenciát mutatták. Ezek szerint a diszperzióstabilitás a sókoncentráció növekedésével csökkent, majd az aggregáció sebessége a gyors aggregációs szakaszban állandósult, ezt 1 körüli stabilitási arány értékek jelzik (14(a). ábra). Az állandó stabilitási arány megmutatja, hogy az áttöltéssel (13. ábra) kialakult negatív felületi töltés nem bizonyult elegendően nagynak a CeNPs diszperzió stabilizációjához nagy sókoncentrációnál, vagyis a felületi töltés ellenére az oldott elektrolit árnyékoló hatása határozta meg a rendszer kolloidkémiai viselkedését. A stabilitási arányt bemutató ábrák általános tendenciái tehát a DLVO elméletnek megfelelően magyarázhatók.

A vizsgált sók között savas közegben is jelentős különbségek figyelhetők meg mind a lassú aggregációs szakaszban, mind pedig a CCC értékeket figyelembe véve. A CeNPs diszperziót az anionok a $\text{SCN}^- < \text{Cl}^- < \text{NO}_3^-$ sorrendben destabilizálják (14(b). ábra), amely nem felel meg a Hofmeister-sorozatnak. Mindkét pH értéken végzett méréseinkben a NO_3^- okoz a legkisebb koncentrációban aggregációt, amit a 10 mM alatti CCC értékek jeleznek. Megállapítható, hogy a CeNPs alkalmazásakor különös figyelmet kell fordítani a NO_3^- jelenlétére, mivel ez az ion már nagyon kis mennyiségben is erősen csökkenti a kolloidstabilitást, a CeNPs felületi töltésétől függetlenül.

Eddigi méréseink során tanulmányoztuk kationok és anionok hatását a CeNPs felületi töltésére és kolloidstabilitására savas, illetve bázikus közegben. Megállapíthatjuk, hogy eredményeink gyakran nem tükrözték a Hofmeister-sorozat alapján várt tendenciát, azonban minden vizsgált rendszerre kis CCC érték volt jellemző. Ez arra enged következtetni, hogy a CeNPs diszperzió jelentős mennyiségű oldott só mellett – például az élő szervezetben, vagy számos ipari folyamatban való felhasználás során – nem képes stabilis kolloidot alkotni. Ez súlyosan korlátozza az egyébként ígéretes nanozyme alkalmazhatóságát, így elengedhetetlen a diszperzióstabilitás növelése, amit az alábbiak szerint polielektrolittal történő funkcionálizálással kívántunk elérni.

5.3. A CeNPs funkcionálizálása polielektrolitokkal

A kolloidstabilitás növelése érdekében a CeNPs-et polielektrolitokkal funkcionáltuk. A polielektrolitok várt adszorpciója (15. ábra) az elektrosztatikus vonzás elvén alapszik, így bázikus közegben (negatív felületi töltés mellett) pozitív töltésű polielektrolitokkal, míg savas közegben (pozitív felületi töltés mellett) negatív töltésű polielektrolitokkal lehetséges a CeNPs funkcionálizálása. Ezek alapján rendre a metil-glikokitozán (MGC) és a heparin (HEP) polielektrolitokat használtuk. A MGC a lánchoz kapcsolódó pozitív töltésű nitrogénatom miatt a diszperzió pH-jától függetlenül mindig pozitív töltéssel rendelkezik, a HEP szulfátcsoportjai pedig erősen savasak, így savas közegben (pH 4) is képesek a polimerlánc negatív töltését biztosítani (4. ábra).

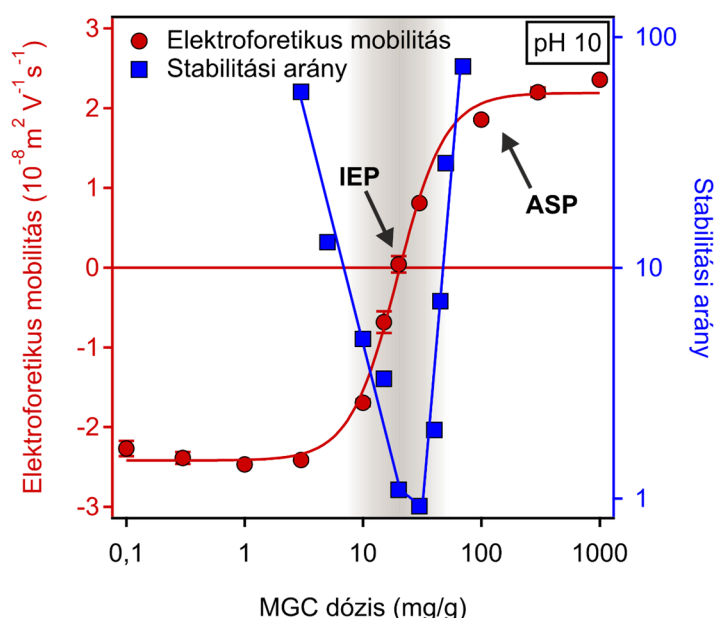


15. ábra: Sematikus ábra polielektrolitok adszorpciójáról és egyforma részecskék aggregációjáról. Az adszorpció bemutatásánál látható fekete vonalak jelölik a polielektrolitokat, az aggregáció szemléltetésénél pedig egy – a folyamat kezdeti szakaszában képződő – dimert ábrázoltunk.

A polielektrolit mennyiségét a továbbiakban a CeNPs-hez viszonyított tömegarányával (dózis) írjuk le: megadjuk, hogy a 1 g CeNPs-hez mekkora tömegű polielektrolit oldatát adagoljuk mg polielektrolit/g CeNPs egységben. A CeNPs koncentrációja továbbra is állandó, 10 mg l⁻¹ volt a kísérletek során.

5.3.1. Funkcionalizálás bázikus közegben

A CeNPs-et tehát bázikus körülmények között (pH 10) MGC polielektrolittal funkcionizáltuk. A mérések során a nanozyme koncentrációt állandó értéken tartottuk, míg az MGC mennyiségét szisztematikusan változtattuk. Az ELS és DLS mérések eredményei a 16. ábrán láthatók.

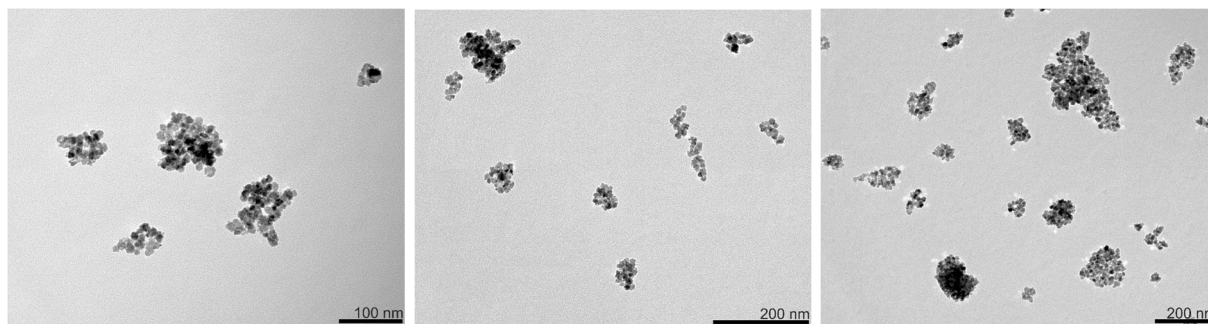


16. ábra: A CeNPs funkcionizálása metil-glikol-kitozánnal (MGC). Piros színnel az MGC-Ce rendszer EPM értékei, míg kék színnel a stabilitási arány értékei láthatók a komponensek arányának (mg MGC/g CeNPs) függvényében. A sötétített régió jelzi az alacsony kolloidstabilitással rendelkező összetétel-tartományt. A CeNPs koncentrációja állandó, 10 mg l^{-1} volt, a mérést 10 mM KCl háttérelektrolit mellett végeztük pH 10 értéken. A folytonos görbék az áttekinthetőséget segítik elő.

Alacsony dózissnál az EPM értékeket a CeNPs felületi töltése határozza meg, amely bázikus közegben negatív. Növekvő mennyiségű MGC hozzáadása a felületi töltés növekedését eredményezi a polielektrolit adszorpciója miatt.⁵⁹ A MGC dózis növelésével a rendszer eléri az IEP-t, ahol az adszorbeálódott polielektrolit semleges össztöltésű felületet eredményez. Az IEP környékén az alacsony stabilitási arány értékek alapján instabil diszperziók jellemzők. Ez értelmezhető a DLVO elmélet segítségével, vagyis az alacsony felületi töltés gyenge taszító kölcsönhatást eredményez az elektromos kettősrétegek között, így a vonzó van der Waals erők a részecskék aggregációját okozzák. Több polielektrolit adszorpciója tovább növeli az EPM-t, és ezzel párhuzamosan a kolloidstabilitást, amit növekvő stabilitási arány értékek jeleznek. A részecske felületének telítődésével elérjük az adszorpciós telítési platót (ASP). Ebben a tartományban már nem adszorbeálódik több polielektrolit a CeNPs felületére, így nagyobb MGC dózis alkalmazása nem változtatja meg jelentősen a felületi töltést.

Az áttöltés jelensége magyarázható a polielektrolitok és a CeNPs közötti elektrosztatikus vonzással, azonban az IEP-hoz tartozó dózis feletti adszorpcióhoz és töltésnövekedéshez hozzájárulhatnak más kölcsönhatások is. Ilyen lehet az adszorpció során felszabaduló oldószermolekulák és a konformáció változása által okozott entrópiahatás,⁶⁰ a töltéskorreláció a felület és a monomerek között,⁶¹ illetve a polielektrolit lánc segmensei között fellépő lehetséges vonzó kölcsönhatások. Ezek jelenlétére egyértelmű kísérleti bizonyítékunk nincs, viszont korábban kimutatásra kerültek polielektrolitok adszorpciója esetében.⁵⁹

A funkcionizált CeNPs-et (MGC-Ce) jellemző MGC dózist ebből a stabil tartományból választottuk ki úgy, hogy a MGC lehető legkisebb feleslegét használjuk a rendszer előállításához (16. ábra). Ezek alapján a továbbiakban vizsgált MGC-Ce részecskék komponenseinek aránya 65 mg MGC/g CeNPs. Az MGC-Ce előállítását a CeNPs törzsdiszperzió és a MGC törzsoldat megfelelő mennyiségeinek összekeverésével végeztük el, az ideális töltésviszonyokhoz szükséges bázikus közeg (pH 10) biztosítása mellett. Az így előállított MGC-Ce rendszert TEM segítségével is vizsgáltuk.

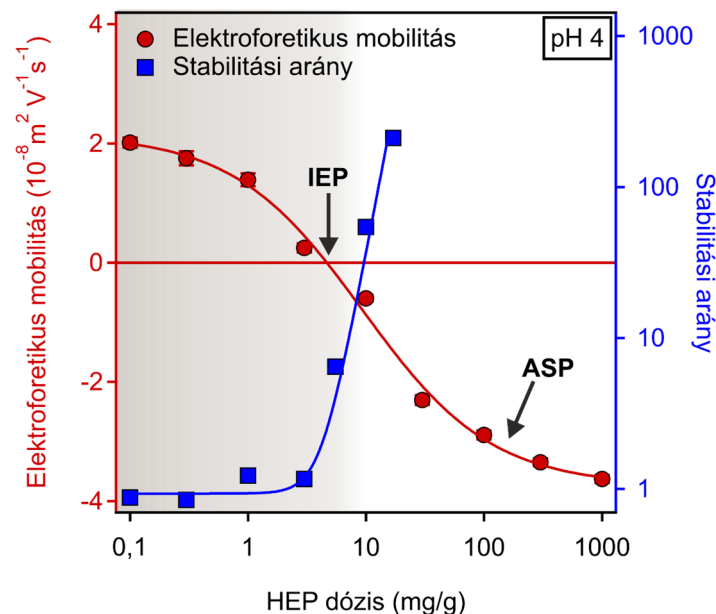


17. ábra: TEM felvételek az előállított MGC-Ce részecskékről

A TEM felvételek (17. ábra) alapján a funkcionizálás nem változtatta meg a CeNPs morfológiáját, az MGC-Ce rendszerre is kis részecskékből álló, változatos méretű és alakú aggregátumok jellemzők. Ezek átlagos hidrodinamikai sugara DLS alapján 163 ± 35 nm, amely nem különbözik jelentősen a CeNPs hidrodinamikai sugarától bázikus közegben (pH 10).

5.3.2. Funkcionizálás savas közegben

A CeNPs felületét savas körülmények között (pH 4) HEP polielektrolittal módosítottuk. Az ELS és DLS mérésekkel követtük a változó HEP dózis hatását a felületi töltésre és a kolloidstabilitásra, ennek eredményei a 18. ábrán láthatók.



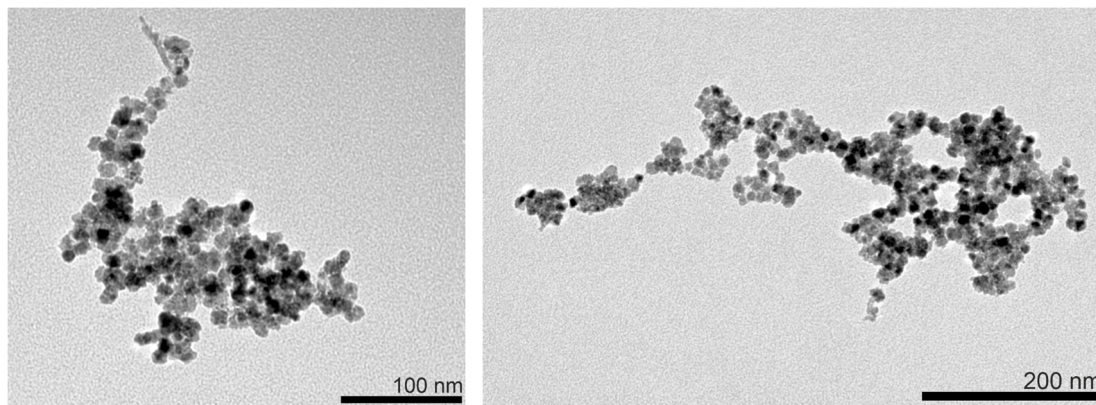
18. ábra: A CeNPs funkcionálizálása heparinnal (HEP). Piros színnel (kör) a HEP-Ce rendszer elektroforetikus mobilitásai, míg kék színnel (négyzet) a stabilitási arány értékei láthatók a komponensek arányának (mg HEP/g CeNPs) függvényében. A sötétített régió jelzi az alacsony kolloidstabilitással rendelkező összetétel-tartományt. A CeNPs koncentrációja állandó, 10 mg l⁻¹ volt, a mérést 10 mM KCl háttélelektrolit jelenlétében végeztük, a minták pH értéke 4 volt. A folytonos görbék célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése.

Alacsony HEP dózissnál a CeNPs pozitív felületi töltése határozza meg az EPM-t. A polielektrolit arányának növelése több HEP adszorpcióját eredményezi a CeNPs felületén, ami csökkenti a mért EPM értékeket. Az MGC-Ce rendszerhez képest fontos eltérés, hogy itt a mérés körülményei között a CeNPs nem tudott stabil diszperziót kialakítani kis HEP dózis mellett, ami az 1 körüli stabilitási arány értékekből látható. Ez az eredmény ismét szemlélteti a funkcionálizálás szükségességét a CeNPs alacsony kolloidstabilitása miatt. A DLVO elmélettel összhangban a kis EPM értékek instabil diszperziókkal párosultak az elektromos kettősrétegek közötti gyenge kölcsönhatások következtében. Kellően nagy HEP dózis nem csak megváltoztatta a felületi töltés előjelét, hanem jelentősen megnövelte annak abszolútértékét is, ezzel hozzájárulva a stabil diszperziók kialakulásához. A DLVO erőhatásokon (3. ábra) kívül, korábbi irodalmi adatokra támaszkodva,⁴⁶ feltételezhetjük sztérikus stabilizáció jelenlétét is, azonban ezt a nagy kolloidstabilitású régióban a fenti eredmények alapján nem tudjuk egyértelműen megkülönböztetni az elektrosztatikus stabilizációtól, ezért elektrosztérikus stabilizációs mechanizmust feltételezhetünk. Ehhez a taszításhoz egyrészt a felületek közötti elektrosztatikus kölcsönhatások, másrészt a felületen adszorbeálódott HEP láncok átlapolódása és a bekövetkező ozmózisnyomás-növekedés is hozzájárulnak.⁶²

A további munkánkhoz használt HEP-Ce rendszer összetételét a stabil tartományból választottuk ki, elkerülve a nagy HEP-felesleg alkalmazását (18. ábra). Ezért a későbbiekben

100 mg HEP/g CeNPs összetételű funkcionizált nanorészecskékkel végeztünk kísérleteket. Az HEP-Ce előállításához a CeNPs törzsdiszperzió és a HEP törzsoldat megfelelő mennyiségeit összekevertük, a megfelelő felületi töltéshez szükséges savas közeg (pH 4) biztosítása mellett.

Az így előállított HEP-Ce rendszert TEM segítségével vizsgáltuk, amely az esetleges morfológiai jellegzetességekre mutathat rá (19. ábra).

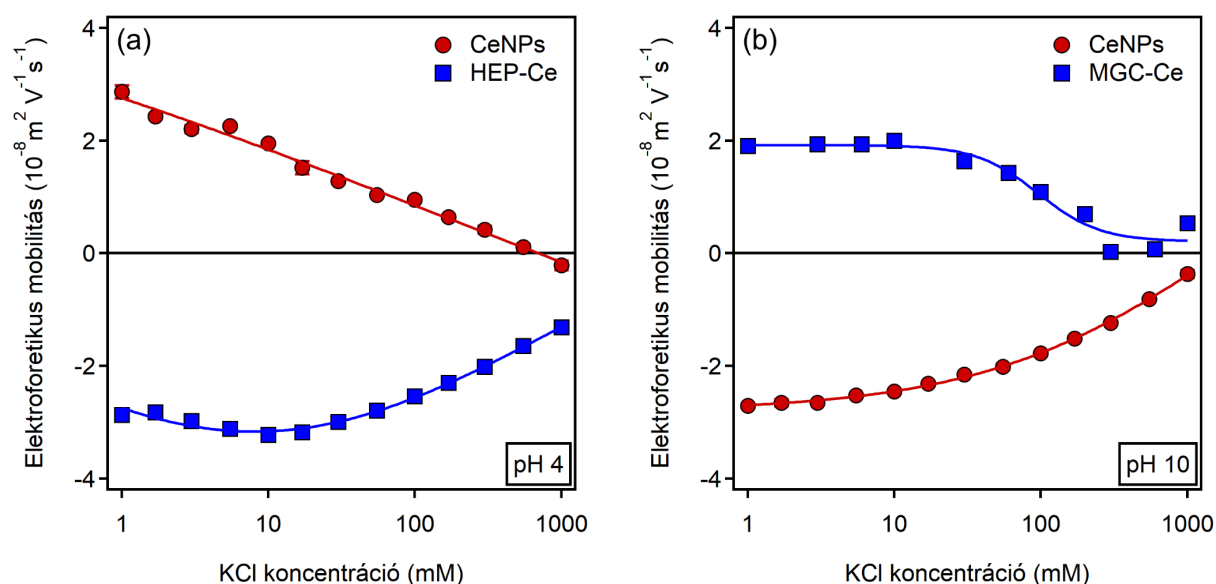


19. ábra: TEM felvételek az előállított HEP-Ce részecskékről.

A TEM felvételek alapján a HEP-Ce szerkezete sem tér el jelentősen a CeNPs-től: itt is a kis méretű CeO_2 részecskékből álló, változatos méretű és alakú aggregátumok jellemzők, amelyek kialakulásához a TEM mintaelőkészítés során alkalmazott szárítás is hozzájárulhatott. Ezek hidrodinamikai sugara DLS alapján 173 ± 30 nm, amely nem tér el jelentősen a CeNPs hidrodinamikai sugarától savas közegben (pH 4).

5.3.3. A funkcionizált CeNPs ionerősség-függő kolloidstabilitása

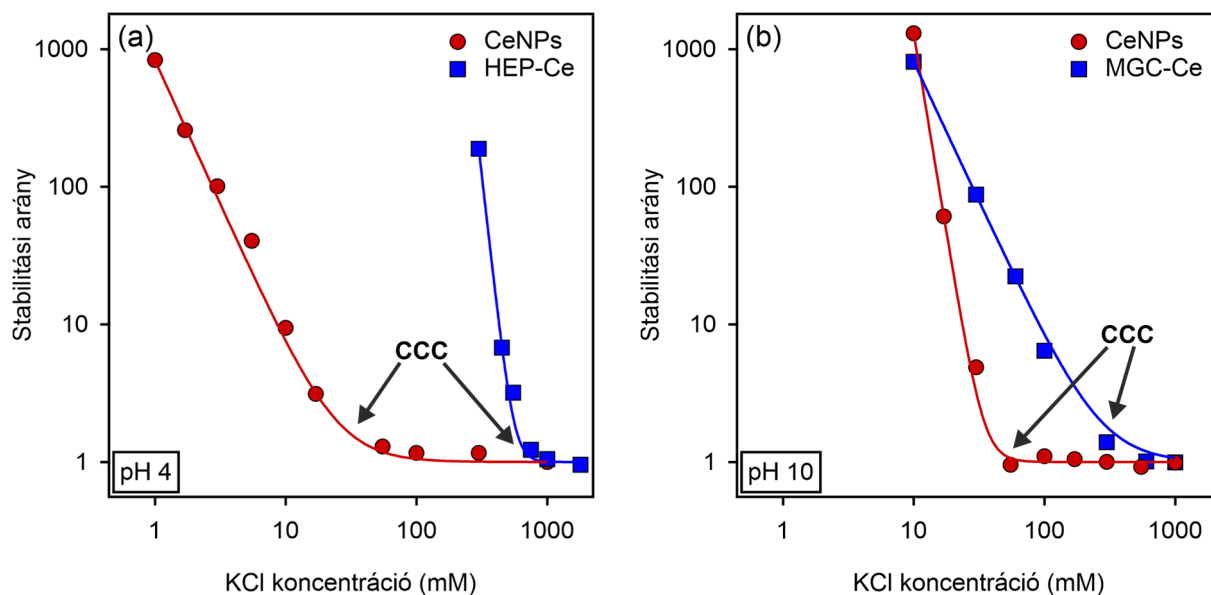
A funkcionizált CeNPs előállítása után vizsgáltuk az adszorbeált polielektrolit réteg hatását a sóindukált aggregációra. Az előzőekben ismertetett eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a CeNPs sötűrése aggregációs szempontból kicsi, ezért a fő kérdés az volt, hogy a polielektrolittal történő funkcionizálás kiküszöböli-e ezt a hátrányos tulajdonságot. A töltésvizsgálat során mért EPM értékek a 20. ábrán kerülnek bemutatásra.



20. ábra: (a) CeNPs, illetve HEP-Ce (100 mg/g) rendszerek EPM értékei az oldott KCl koncentráció függvényében, pH 4 érték mellett. (b) CeNPs, illetve MGC-Ce (65 mg/g) rendszerek EPM értékei az oldott KCl koncentráció függvényében, pH 10 érték mellett. A CeNPs koncentrációja minden mérés során 10 mg l^{-1} volt. A folytonos görbék célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése.

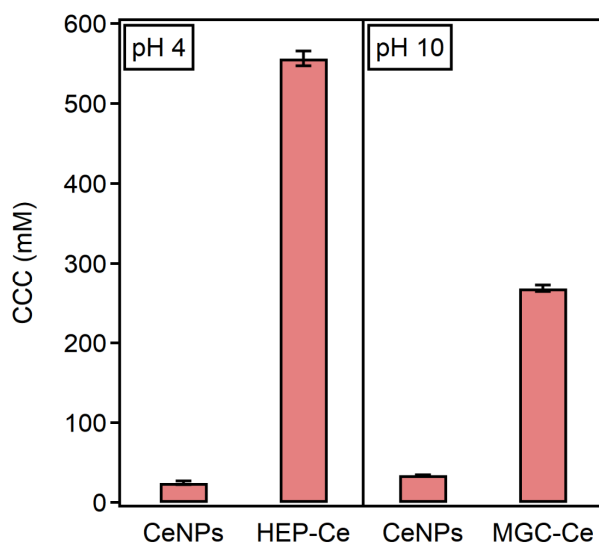
Kis sókoncentráció mellett minden rendszer EPM értéke összhangban volt a megfelelő CeNPs-et tartalmazó részecske felületi töltésével (16. és 18. ábra). Savas közegben, alacsony ionerősségnél az EPM nagyságrendje hasonló volt a CeNPs és a HEP-Ce rendszerekben, összemérhető erősségű elektrosztatikus kölcsönhatásokat jelezve. Lúgos közegben azonban a felületmódosítás kisebb nagyságrendű töltést eredményezett. Általánosságban, az EPM abszolútértékei a sókoncentráció növelésével, a felületi töltés – oldott ionok általi – árnyékolása miatt csökkentek, azonban a CeNPs és a funkcionáliszt CeNPs adatai különböző mértékben és eltérő tendenciával változtak. A CeNPs esetén az EPM abszolútértéke a sókoncentráció növelésével párhuzamosan folyamatosan csökkent, azonban a HEP-Ce és MGC-Ce rendszerek széles sókoncentráció-tartományban közel állandó EPM értékekkel rendelkeztek. Ez a jelenség más polielektrolit-nanorészecske rendszerekre ismert, és a polielektrolit-réteg szerkezetének változásával magyarázható.⁴⁵ A HEP-Ce és MGC-Ce viselkedése között is jelentős különbség látható. A HEP-Ce igen nagy EPM értékekkel rendelkezik a kísérlet körülményei között, azonban az MGC-Ce EPM értékei már kis sókoncentrációnál is alacsonynak mondhatók a többi vizsgált részecskehez képest.

A fenti töltésviszonyok kolloidstabilitásra gyakorolt hatását a stabilitási arány értékek meghatározásával követtük. A módosítatlan és funkcionáliszt CeNPs kolloidstabilitását összehasonlítottuk, eredményeink a 21. ábrán láthatók.



21. ábra: (a) CeNPs, illetve a HEP-Ce (100 mg/g) rendszer stabilitási arány értékei az oldott KCl koncentráció függvényében, pH 4 érték mellett. (b) CeNPs, illetve a MGC-Ce (65 mg/g) rendszer stabilitási arány értékei az oldott KCl koncentráció függvényében pH 10 érték mellett. A CeNPs koncentrációja minden mérés során 10 mg l^{-1} volt. A mért adatpontokat a (8) egyenlettel illesztettük.

Általános megállapítás, hogy – összhangban a DLVO elmélettel – a KCl koncentráció növelése minden rendszer esetén a kolloidstabilitás csökkenését okozta. Az 1 körüli stabilitási arány értékekkel jellemezhető gyors aggregációs tartományt minden rendszer elérte, azonban az ehhez szükséges KCl koncentrációkban nagyságrendi eltérést tapasztaltunk. Ezt a különbséget számszerűsíthetjük a (8) egyenlet alapján számított CCC értékekkel (22. ábra).



22. ábra: A CeNPs, HEP-Ce, illetve MGC-Ce rendszerek CCC értékeinek összehasonlítása. Az ábra bal oldalán a 20(a). ábra, míg a jobb oldalon a 20(b). ábra adatainak illesztésével kapott CCC értékek szerepelnek, a (8) egyenlet alapján.

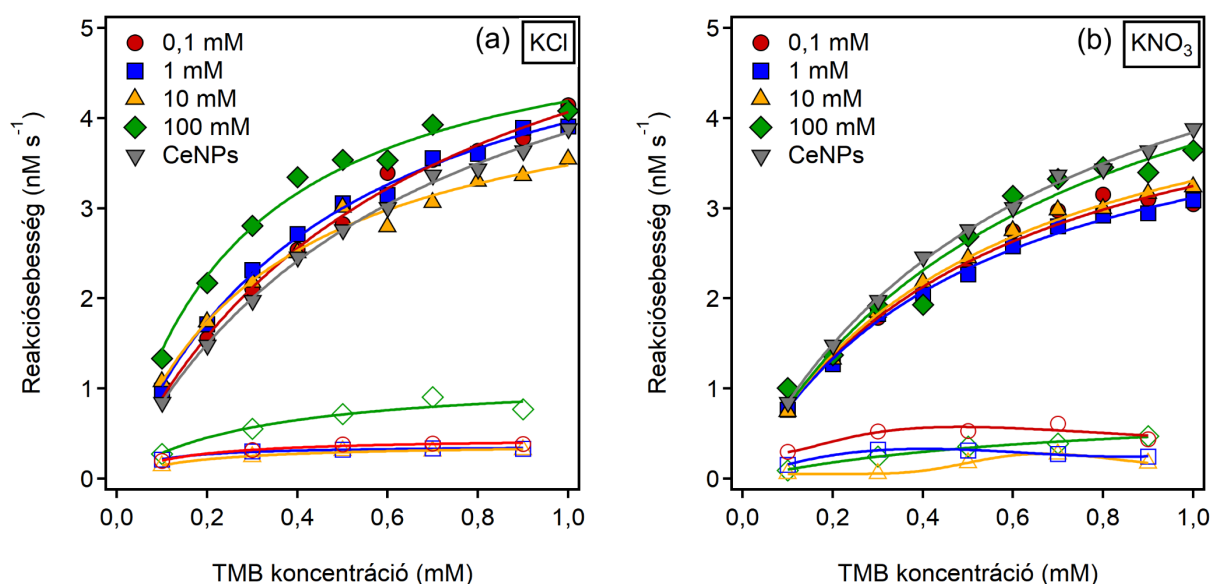
A 22. *ábra* még szembetűnőbbé teszi a kolloidstabilitásokban mutatkozó különbséget. A HEP polielektrolittal történő funkcionálizálás 23-szoros, míg a MGC polielektrolittal történő funkcionálizálás 8-szoros különbséget eredményezett a CCC értékekben. A stabilizáláshoz valószínűleg elektrosztatikus és sztérikus hatások is hozzájárulnak. A nagy felületi töltés az elektromos kettősrétegek között erős elektrosztatikus taszító erőket hoz létre a DLVO elmélet alapján, továbbá nagy sókoncentráció hatására a felületre adszorbeálódott polielektrolit-réteg megduzzadhat,⁶³ amely számottevő sztérikus taszítást eredményez.⁴⁶ A HEP-Ce rendszer nagy EPM értékei az elektrosztatikus stabilizáció jelentős hozzájárulására utalnak, azonban a MGC-Ce rendszer viszonylag alacsony EPM értékei alapján a MGC elsősorban sztérikus stabilizáló hatást fejt ki a CeNPs diszperzióra.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a CeNPs stabilizálása savas és bázikus körülmények között is sikeres volt, a HEP és MGC polielektrolitok alkalmasak CeNPs kolloidstabilitásának megőrzésére akár szélsőségesen magas sókoncentráció mellett. A következő fejezetben a felületi töltés és kolloidstabilitás hatását vizsgáljuk az enzimszerű aktivitásra.

5.4. Az enzimutánzó aktivitás felmérése

5.4.1. Oldott sók hatása a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitására

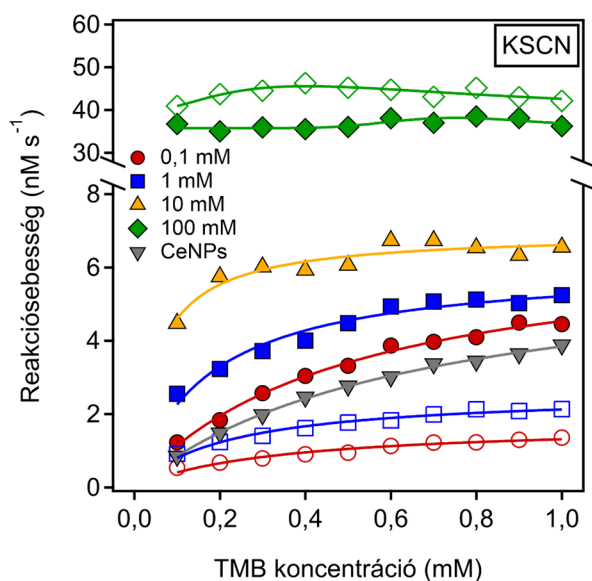
Munkánk következő fázisában a savas közegben (pH 4) kolloidkémiai szempontból már vizsgált sók peroxidáz-utánzó aktivitásra gyakorolt hatását mértük fel. A TMB oxidációja hidrogén-peroxid és megfelelő katalizátor mellett színváltozással jár (6. *ábra*), amit a spektrofotometria módszerével követtünk. Az abszorbanciaváltozás sebessége a reakciósebességgel arányos, amely így kiszámítható a (10) egyenlet segítségével.



23. ábra: A CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitása KCl (a), illetve KNO₃ (b) jelenlétében. Mindkét ábrán szürke színnel (fordított háromszög) szerepel a CeNPs aktivitása hozzáadott só nélküli rendszerben. Az üres szimbólumok a kontrollkísérletek eredményeit mutatják be, amelyek nem tartalmaztak CeNPs-et, a sókoncentráció pedig megegyezett az azonos színű és alakú teli szimbólumokhoz tartozó értékkel. A mérések során savas körülményeket (pH 4) alkalmaztunk. A CeNPs-et tartalmazó rendszerek (teli szimbólumok) adatpontjait a (11) egyenlet alapján illesztettük, míg a kontrollkísérletekhez tartozó folytonos görbék célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése.

A CeNPs jelenléte nélkül elvégzett kontrollkísérletek igazolták, hogy a KCl és KNO₃ sók a vizsgált koncentrációk mellett nem befolyásolják jelentősen a TMB – H₂O₂ rendszer reakcióját. A kontrollkísérletekben mért, 0-hoz közeli reakciósebesség értékek alapján tehát elmondhatjuk, hogy CeNPs jelenlétében tisztán a nanozyme katalitikus aktivitását méri a peroxidáz teszt. Az egyetlen kivétel a KCl lehet 100 mM koncentrációban, amely CeNPs nélkül is kis mennyiségű kék színű oxidációs termék megjelenését okozza (23(a). ábra). Ez valószínűleg összefüggésben áll a CeNPs 100 mM KCl jelenlétében mért aktivitásának kis megemelkedésével a többi koncentrációhoz képest. Ettől eltekintve az igen hasonló illesztett Michaelis-Menten görbék (11. egyenlet) alapján a CeNPs aktivitását a vizsgált KCl és KNO₃ koncentrációk nem befolyásolták jelentősen. A Michaelis-Menten paraméterek, amelyek sók közötti különbségeket számszerűsítik, a 25. ábrán találhatóak. A Michaelis-Menten modell alapján a szubsztrátkoncentráció növelése telíti a katalizátor aktív kötőhelyeit, így a reakció sebessége nem haladhat meg egy maximális értéket ($v_{\max}$). A $v_{\max}$ felének eléréséhez szükséges szubsztrátkoncentráció a Michaelis-Menten állandó (K_M), amely fordítottan arányosnak tekinthető a szubsztrát affinitásával a katalizátorhoz.

A peroxidáz-utánzó aktivitást KSCN jelenlétében is vizsgáltuk, eredményeinket a 24. ábrán foglaltuk össze.

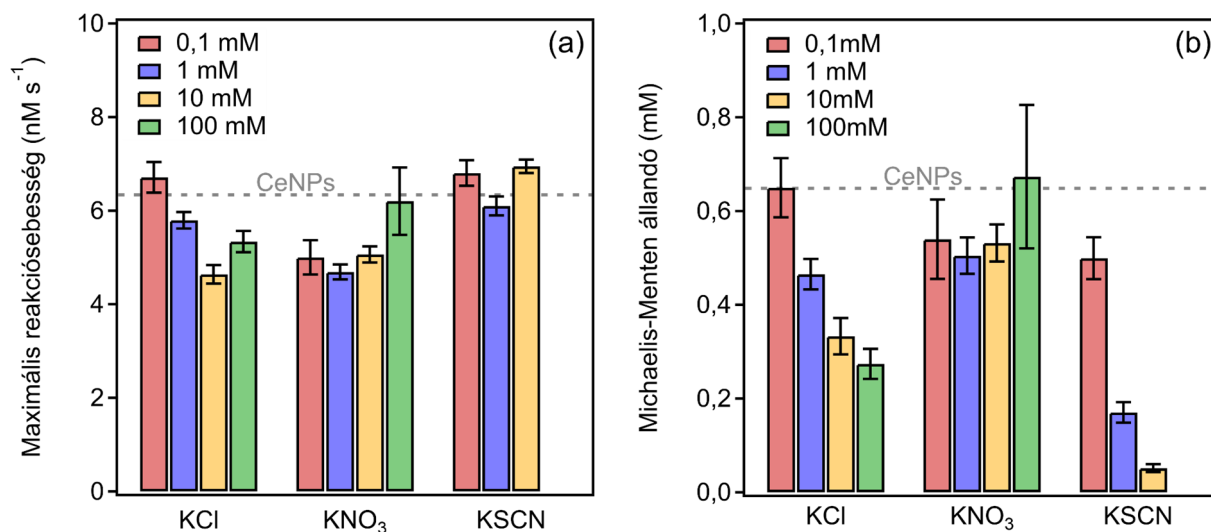


24. ábra: A peroxidáz teszt eredménye KSCN jelenlétében a reakciósebesség-szubsztrátkoncentráció görbékkel kifejezve. A reakciósebesség értékekben mért jelentős különbségek miatt az y-tengely megtörésére volt szükség. Az ábrán szürke színnel szerepel a CeNPs aktivitása hozzáadott só nélküli rendszerben. Az üres szimbólumok a kontrollkísérletek eredményeit mutatják be, amelyek nem tartalmaztak CeNPs-et, a sókoncentráció pedig megegyezett az azonos színű és formájú teli szimbólumokhoz tartozó értékkel. Az ábra alsó részén látható CeNPs-et tartalmazó rendszerek adatsorait a (11) egyenlettel illesztettük, a többi esetben a folytonos görbék célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése.

A reakciósebesség értékekben nagyságrendi eltérést tapasztaltunk a különböző sókoncentrációk között, így a megfelelő tengely megtörésével segítettük elő az eredmények áttekinthetőségét (24. ábra). A kontrollkísérletekből megállapítható, hogy a KSCN önmagában is befolyásolja a peroxidáz teszt eredményét: már 0,1 mM koncentrációban mérhető mennyiségű TMB oxidációját okozza. Ez váratlan eredménynek számít, a KSCN jelenlétében lejátszódó oxidáció mechanizmusa pedig egyelőre ismeretlen. 10 mM sókoncentrációnál hiányzik a kontrollkísérlethez tartozó adatsor. Ennek oka, hogy a szemmel látható jelentős színreakció ellenére az abszorbancia-idő grafikon alakja számottevően különbözött a várttól, így nem tudtuk egyenes illesztésével kiszámítani a reakciósebességet. Ennek hátterében valószínűleg bonyolultabb reakciómechanizmus áll, és különböző termékek képződése is elképzelhető. A jelenség részletes feltérképezése egy jövőbeni kutatási projekt témája lehet.

A CeNPs-t tartalmazó rendszerekben mért aktivitás alapján 0,1 mM és 1 mM KSCN jelenlétében a KSCN és CeNPs hatása additívnak tekinthető. Azonban 100 mM KSCN önmagában is a korábbiaknál egy nagyságrenddel nagyobb, a TMB koncentrációjától lényegében független reakciósebességeket eredményez. Ennél a TMB koncentrációnál a CeNPs hatása nem mérhető, a kapott adatsor pedig nem illeszthető a Michaelis-Menten modellel (11).

Az eddig bemutatott mérési eredményeink alapján számolt Michaelis-Menten paramétereket a 25. ábrán foglaltuk össze.



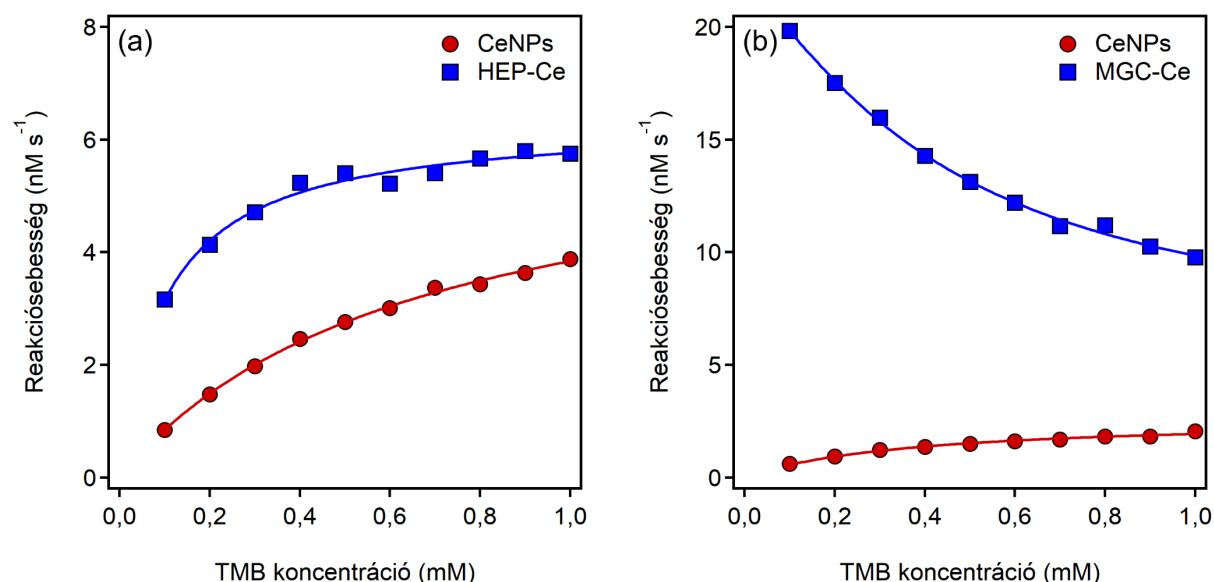
25. ábra: Eddigi eredményeink Michaelis-Menten paramétereit: (a) maximális reakciósebesség és (b) Michaelis-Menten állandó. A hozzáadott só nélküli rendszerben végzett mérés eredményét mindkét ábrán szaggatott, szürke színű vonallal és CeNPs felirattal jelöltük. A 100 mM KSCN-t tartalmazó rendszerhez tartozó adatsort nem illeszthettük a (11) egyenlettel, így az ehhez tartozó oszlop erről az ábráról hiányzik.

A maximális reakciósebesség KCl és KNO₃ hozzáadására a legtöbb koncentrációban kismértékben csökkent (25(a). ábra). A KCl esetén a 100 mM sókoncentráció megszakítja a csökkenő tendenciát, ez pedig a KCl által ilyen koncentrációban okozott színreakciónak tulajdonítható (23(a). ábra). A KSCN adagolásával a Michaelis-Menten modell (11. egyenlet) által előrejelzett maximális reakciósebesség ugyan nem változott jelentősen, de a gyakorlatban mérhető időtartamon belül az aktivitás növekedését tapasztaltuk (24. ábra).

A Michaelis-Menten állandó (K_M) értéke a KCl koncentráció növelésével csökkent, ami a szubsztrát affinitásának növekedését jelzi a katalizátor felületéhez, kolloidkémiai méréseinkkel összhangban (13. ábra). A sókoncentráció növelésével az elektromos kettősréteg vastagsága csökken, és elektrosztatikus taszító hatása kevésbé érvényesül,³² ami segítheti a szubsztrát megkötődését a CeNPs felületén. A KNO₃ esetén a K_M értéke nem függ jelentősen a koncentrációtól. Ennek oka lehet, hogy a CeNPs diszperziója kis KNO₃ koncentrációnál is instabilnak bizonyult (14(a). ábra). A KSCN esetén a K_M csökkenése elsősorban annak tulajdonítható, hogy a só önállóan is elősegíti a TMB oxidációját, valamint ennek hozzájárulása a mért reakciósebesség értékekhez nagy KSCN koncentrációnál jelentősebb.

5.4.2. Polielektrolitok hatása a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitására

A funkcionizált CeNPs-et is vizsgáltuk a peroxidáz teszt segítségével. Célunk volt feltérképezni, hogy a felület polielektrolitokkal történő módosítása hogyan befolyásolja a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitását. Eredményeinket a 26. ábra foglalja össze.

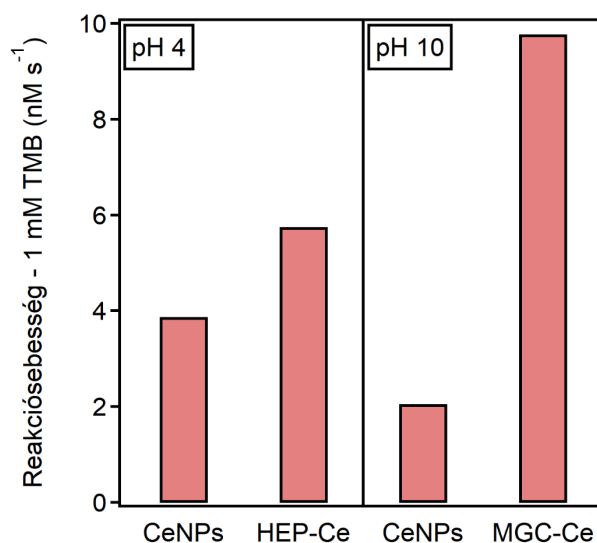


26. ábra: A CeNPs és HEP-Ce (a), valamint a CeNPs és MGC-Ce (b) rendszerek peroxidáz-aktivitásának összehasonlítása. A (b) ábrán szereplő nanozyme-ok törzsdiszperziója a minták készítésekor pH 10-es volt, az MGC-Ce képződéséhez szükséges körülmények miatt. A CeNPs és HEP-Ce rendszerek adatpontjait a (11) egyenlettel illesztettük, az MGC-Ce adatpontjaira rajzolt folytonos görbe célja kizárólag az áttekinthetőség elősegítése, mert az adatsor a (11) egyenlettel nem illeszthető.

Eredményeink alapján mindkét polielektrolit jelentősen megnövelte a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitását a reakciósebesség értékeket figyelembe véve. A 26(a). ábrán látható, hogy a HEP-Ce rendszer reakciósebesség értékei jól illeszthetők a Michaelis-Menten modellel (11. egyenlet), valamint számottevően felülmúlják a CeNPs-et minden vizsgált TMB koncentráció mellett.

Az MGC-Ce rendszer előállításához bázikus körülmények (pH 10) voltak szükségesek a megfelelő töltésviszonyok biztosításához, így pH 10-re állított törzsdiszperziók álltak rendelkezésünkre. A peroxidáz teszthez azonban legalább enyhén savas közeg szükséges. Így a 26(b). ábra elkészítésénél a savas kémhatású (pH 4) törzsoldatokhoz és oldószerhez kis mennyiségű (80 μl), viszonylag tömény, bázikus (pH 10) CeNPs, illetve MGC-Ce törzsdiszperziókat (500 mg l^{-1}) adtunk, így minimalizálva a pH változását. A két rendszer közötti különbség még szembetűnőbb, mint a HEP-Ce esetében, hiszen nem csak a reakciósebesség értékekben történt nagyobb növekedés, de a reakciómechanizmus is változott. Az MGC-Ce rendszer kiugróan magas, azonban a TMB növekvő koncentrációjával csökkenő aktivitásának mechanizmusa még nem tisztázott és további kutatómunka alapját képezi.

Ezúttal nem illeszthettünk minden adatsort a Michaelis-Menten egyenlet (11) segítségével, így az aktivitások szemléletes összehasonlításához az 1,0 mM TMB koncentrációnál mért reakciósebesség értékeket használtuk fel (27. ábra).



27. ábra: A CeNPs, HEP-Ce és MGC-Ce nanozyme rendszerek összehasonlítása a peroxidáz teszt alapján. Az 1 mM TMB koncentráció mellett mért reakciósebesség értékeket ábrázoltuk. A pH 4 és pH 10 feliratok kizárólag a törzsdiszperziók pH értékét jelzik, minden teszt savas közegben zajlott.

A fenti reakciósebesség értékek alapján is kijelenthetjük, hogy a HEP és MGC polielektrolitokkal történő funkcionizálás számottevően megnövelte a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitását, valamint hogy a MGC jelenléte a legelőnyösebb az enzimutánzó hatás szempontjából. A HEP-Ce rendszer aktivitását jól jellemezte a Michaelis-Menten modell (26(a). ábra). Az enzimutánzó hatás növekedéséhez hozzájárulhatott a rendszer CeNPs-nél jóval nagyobb koloidstabilitása, hiszen a lassú aggregáció és a kis méretű részecskék nagy fajlagos felületet biztosítanak, ami előnyös a felületen lejátszódó katalitikus folyamat szempontjából. A MGC-Ce rendszer esetében is érvényesülhetett ez a stabilizáció, azonban a kiugróan magas reakciósebesség értékek és az eltérő tendencia alapján a MGC ezen felül is befolyásolja a peroxidáz-utánzó aktivitást (26(b). ábra). A MGC polielektrolit és a TMB szubsztrát között valószínűleg erős vonzóerők lépnek fel, amelyhez hidrogénhidak és hidrofób kölcsönhatások is hozzájárulhatnak. Ez elősegítheti a szubsztrát hozzáférését a CeNPs felületéhez, valamint magyarázatot adhat a mért görbe alakjára, ami a TMB gátló hatására utal.⁶⁴

Eredményeink alapján a HEP-Ce és MGC-Ce rendszerek ígéretes peroxidáz-utánzó antioxidáns nanozyme-nak tekinthetők, amelyhez megnövekedett aktivitásuk és kiemelkedő koloidstabilitásuk is hozzájárul.

6. ÖSSZEGZÉS

Munkánk során a CeO₂ nanozyme kolloidkémiai tulajdonságait és antioxidáns, enzimutánzó hatását tanulmányoztuk.

A CeNPs-et előállítottuk és karakterizáltuk, különös hangsúlyt fektetve a kolloid diszperzió jellemzésére. A CeNPs savas közegben pozitív, bázikus közegben pedig negatív felületi töltéssel rendelkeznek, így kutatásunk mindkét körülmény vizsgálatára kiterjedt.

CeNPs bázikus közegű diszperzióinak stabilitását tanulmányoztuk különböző egyértékű oldott kationok (Na⁺, K⁺, Cs⁺) és anionok (Cl⁻, NO₃⁻, SCN⁻) jelenlétében. A vizsgált kationok viszonyát értelmezhetjük a Hofmeister-sorozat segítségével, azonban az anionok a sorozattól eltérő viselkedést mutattak. Az anionok destabilizáló hatása savas közegben is különbözött a Hofmeister-sorozattól. Savas és bázikus közegben is a KNO₃ só destabilizálta legkisebb koncentrációban a CeNPs-et, így a jelenlétére a továbbiakban kiemelt figyelmet kell fordítanunk. Megállapíthattuk, hogy minden vizsgált só már kis koncentrációban gyors aggregációt eredményez, ami a gyakorlatban jelentősen csökkenti a nanorészecskék alkalmazhatóságát, így elengedhetetlenné vált a CeNPs diszperzióstabilitásának növelése.

Ennek érdekében a CeNPs-et funkcionalizáltuk a felületi töltéssel ellentétes töltésű polielektrolitokkal: savas közegben heparinnal, bázikus közegben metil-glikol-kitozánnal. A megfelelő polielektrolit-mennyiség jelenlétében mindkét esetben megváltozott a felületi töltés előjele, és stabil diszperziókat állítottunk elő. A sófüggő aggregáció vizsgálatánál mindkét funkcionizált rendszer kolloidstabilitása messze felülmúlta a módosítatlan CeNPs-et.

A korábban is vizsgált sók nem befolyásolták jelentősen a CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitását, amely lehetővé teszi az antioxidáns hatás kihasználását akár nagy ionerősség mellett is. A KSCN só mérése kihívásokba ütközött, mert önmagában is igen erős színreakciót váltott ki a teszt körülményei között.

A funkcionizált CeNPs peroxidáz-utánzó aktivitása jelentősen nagyobbak bizonyult a módosítatlan CeNPs-hez képest. Az MGC-Ce rendszer mutatkozott a leghatékonyabb nanozyme-nak, továbbá különösen nagy aktivitását szokatlan mechanizmus jellemezte.

A munkánk során előállított funkcionizált CeNPs megnövelt peroxidáz-utánzó aktivitása kiemelkedő kolloidstabilitással párosult. Eredményeink magas sókoncentráció mellett is ígéretes antioxidáns nanozyme-okat mutatnak be, valamint fontos információt szolgáltatnak a CeNPs alkalmazását, illetve hasonló rendszerek fejlesztését célzó kutatásoknak.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- (1) Sies, H.; Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2020**, *21* (7), 363-383.
- (2) Nolfi-Donagan, D.; Braganza, A.; Shiva, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology* **2020**, *37*, 101674.
- (3) Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **1997**, *82* (2), 291-295.
- (4) Matés, J. M.; Pérez-Gómez, C.; De Castro, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* **1999**, *32* (8), 595-603.
- (5) Forman, H. J.; Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20* (9), 689-709.
- (6) Szerlauth, A.; Varga, Á.; Madácsy, T.; Sebők, D.; Bashiri, S.; Skwarczynski, M.; Toth, I.; Maléth, J.; Szilagyí, I. Confinement of Triple-Enzyme-Involved Antioxidant Cascade in Two-Dimensional Nanostructure. *ACS Materials Letters* **2023**, *5* (2), 565-573.
- (7) Hoang, H. T.; Moon, J.-Y.; Lee, Y.-C. Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics* **2021**, *8* (4).
- (8) Lourenço, S. C.; Moldão-Martins, M.; Alves, V. D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules* **2019**, *24* (22).
- (9) López de Dicastillo, C.; Rodríguez, F.; Guarda, A.; Galotto, M. J. Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *136*, 1052-1060.
- (10) Lin, Y.; Ren, J.; Qu, X. Catalytically Active Nanomaterials: A Promising Candidate for Artificial Enzymes. *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47* (4), 1097-1105.
- (11) Singh, H. P.; Gupta, N.; Sharma, R. K. Hollow Silica Nanoparticles as Support for Catalase Enzyme Immobilization. *Catalysis Letters* **2013**, *143* (12), 1304-1311.
- (12) Wu, J.; Wang, X.; Wang, Q.; Lou, Z.; Li, S.; Zhu, Y.; Qin, L.; Wei, H. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II). *Chemical Society Reviews* **2019**, *48* (4), 1004-1076.
- (13) Zandieh, M.; Liu, J. Nanozymes: Definition, Activity, and Mechanisms. *Advanced Materials* **2024**, *36* (10), 2211041.
- (14) Halmagyí, T. G.; Noureen, L.; Szerlauth, A.; Szilagyí, I. Engineering inorganic nanozyme architectures for decomposition of reactive oxygen species. *Dalton Transactions* **2024**, *53* (34), 14132-14138.
- (15) Liu, Q.; Zhang, A.; Wang, R.; Zhang, Q.; Cui, D. A Review on Metal- and Metal Oxide-Based Nanozymes: Properties, Mechanisms, and Applications. *Nano-micro Letters* **2021**, *13* (1), 154.
- (16) Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials* **2004**, *3* (12), 891-895.
- (17) Alsharif, N. B.; Bere, K.; Sáringer, S.; Samu, G. F.; Takács, D.; Hornok, V.; Szilagyí, I. Design of hybrid biocatalysts by controlled heteroaggregation of manganese oxide and sulfate

latex particles to combat reactive oxygen species. *Journal of Materials Chemistry B* **2021**, 9 (24), 4929-4940.

(18) Kuah, E.; Toh, S.; Yee, J.; Ma, Q.; Gao, Z. Enzyme Mimics: Advances and Applications. *Chemistry – A European Journal* **2016**, 22 (25), 8404-8430.

(19) Yuan, G.; Mai, Y.; Chen, J.; Nie, Y.; Wang, C.; Liu, Q.; Tian, X.; Pan, Y. Application of Nanozymes in Biomedical Imaging. *Analysis & Sensing* **2024**, 4 (1), e202300048.

(20) Li, X.; Zhu, H.; Liu, P.; Wang, M.; Pan, J.; Qiu, F.; Ni, L.; Niu, X. Realizing selective detection with nanozymes: Strategies and trends. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, 143, 116379.

(21) Wang, Q.; Wei, H.; Zhang, Z.; Wang, E.; Dong, S. Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, 105, 218-224.

(22) Korsvik, C.; Patil, S.; Seal, S.; Self, W. T. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chemical Communications* **2007**, (10), 1056-1058.

(23) Xiao, G.; Li, H.; Zhao, Y.; Wei, H.; Li, J.; Su, H. Nanoceria-Based Artificial Nanozymes: Review of Materials and Applications. *ACS Applied Nano Materials* **2022**, 5 (10), 14147-14170.

(24) Alsharif, N. B.; Samu, G. F.; Sáringer, S.; Szerlauth, A.; Takács, D.; Hornok, V.; Dékány, I.; Szilagyi, I. Antioxidant colloids via heteroaggregation of cerium oxide nanoparticles and latex beads. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2022**, 216, 112531.

(25) Yan, R.; Sun, S.; Yang, J.; Long, W.; Wang, J.; Mu, X.; Li, Q.; Hao, W.; Zhang, S.; Liu, H.; et al. Nanozyme-Based Bandage with Single-Atom Catalysis for Brain Trauma. *ACS Nano* **2019**, 13 (10), 11552-11560.

(26) Kim, Y. G.; Lee, Y.; Lee, N.; Soh, M.; Kim, D.; Hyeon, T. Ceria-Based Therapeutic Antioxidants for Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2024**, 36 (10), 2210819.

(27) Liu, B.; Huang, Z.; Liu, J. Boosting the oxidase mimicking activity of nanoceria by fluoride capping: rivaling protein enzymes and ultrasensitive F⁻ detection. *Nanoscale* **2016**, 8 (28), 13562-13567.

(28) Chen, W.; Xue, J.; Bao, Y.; Feng, L. Surface engineering of nano-ceria facet dependent coupling effect on Pt nanocrystals for electro-catalysis of methanol oxidation reaction. *Chemical Engineering Journal* **2020**, 381, 122752.

(29) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press, 2011.

(30) Tombácz, E.; Libor, Z.; Illés, E.; Majzik, A.; Klumpp, E. The role of reactive surface sites and complexation by humic acids in the interaction of clay mineral and iron oxide particles. *Organic Geochemistry* **2004**, 35 (3), 257-267.

(31) Holmberg, K.; Shah, D. O.; Schwuger, M. J. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*; Wiley, 2002.

(32) Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 309 (2), 194-224.

- (33) Derjaguin, B.; Landau, L. D. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochimica URSS* **1941**, *14* (6), 633-662.
- (34) Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G.; van Nes, K. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids: The Interaction of Sol Particles Having an Electric Double Layer*; Elsevier Publishing Company, 1948.
- (35) Barouch, E.; Matijević, E.; Wright, T. H. Effects of Born Repulsion on Particle Detachment. *Chemical Engineering Communications* **1987**, *55* (1-6), 29-40.
- (36) Huang, Y.; Ren, J.; Qu, X. Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications. *Chemical Reviews* **2019**, *119* (6), 4357-4412.
- (37) Hofmeister, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **1888**, *24* (4), 247-260.
- (38) Wei, W. Hofmeister Effects Shine in Nanoscience. *Advanced Science* **2023**, *10* (22), 2302057.
- (39) Hegedűs, T.; Takács, D.; Vásárhelyi, L.; Szilágyi, I.; Kónya, Z. Specific Ion Effects on Aggregation and Charging Properties of Boron Nitride Nanospheres. *Langmuir* **2021**, *37* (7), 2466-2475.
- (40) Katana, B.; Takács, D.; Csapó, E.; Szabó, T.; Jamnik, A.; Szilagy, I. Ion Specific Effects on the Stability of Halloysite Nanotube Colloids-Inorganic Salts versus Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry B* **2020**, *124* (43), 9757-9765.
- (41) Oncsik, T.; Trefalt, G.; Borkovec, M.; Szilagy, I. Specific Ion Effects on Particle Aggregation Induced by Monovalent Salts within the Hofmeister Series. *Langmuir* **2015**, *31* (13), 3799-3807.
- (42) López-León, T.; Santander-Ortega, M. J.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D. Hofmeister Effects in Colloidal Systems: Influence of the Surface Nature. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (41), 16060-16069.
- (43) G. Lopez, C.; Matsumoto, A.; Shen, A. Q. Dilute polyelectrolyte solutions: recent progress and open questions. *Soft Matter* **2024**, *20* (12), 2635-2687.
- (44) Van Houten, J.; Barberi, R. C.; King, J.; Ogata, A. F. Improving the colloidal stability of protein@ZIF-8 nanoparticles in biologically relevant buffers. *Materials Advances* **2024**, *5* (14), 5945-5957.
- (45) Akdeniz, B.; Wood, J. A.; Lammertink, R. G. H. Diffusiophoretic Behavior of Polyelectrolyte-Coated Particles. *Langmuir* **2024**, *40* (11), 5934-5944.
- (46) Pavlovic, M.; Li, L.; Dits, F.; Gu, Z.; Adok-Sipiczki, M.; Szilagy, I. Aggregation of layered double hydroxide nanoparticles in the presence of heparin: towards highly stable delivery systems. *RSC Advances* **2016**, *6* (20), 16159-16167.
- (47) Sáringer, S.; Terjéki, G.; Varga, Á.; Maléth, J.; Szilágyi, I. Optimization of Interfacial Properties Improved the Stability and Activity of the Catalase Enzyme Immobilized on Plastic Nanobeads. *Langmuir* **2024**, *40* (31), 16338-16348.
- (48) Alquwaizani, M.; Buckley, L.; Adams, C.; Fanikos, J. Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications. *Current Emergency and Hospital Medicine Reports* **2013**, *1* (2), 83-97.

- (49) Caputo, F.; Mameli, M.; Sienkiewicz, A.; Licoccia, S.; Stellacci, F.; Ghibelli, L.; Traversa, E. A novel synthetic approach of cerium oxide nanoparticles with improved biomedical activity. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 4636.
- (50) Schärftl, W. *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions*; Springer, 2007.
- (51) Hassan, P. A.; Rana, S.; Verma, G. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir* **2015**, *31* (1), 3-12.
- (52) Rouster, P.; Pavlovic, M.; Szilagy, I. Destabilization of Titania Nanosheet Suspensions by Inorganic Salts: Hofmeister Series and Schulze-Hardy Rule. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (27), 6749-6758.
- (53) Grolimund, D.; Elimelech, M.; Borkovec, M. Aggregation and deposition kinetics of mobile colloidal particles in natural porous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, *191* (1), 179-188.
- (54) Engelhardt, M. B.; Sugimoto, T.; Papastavrou, G.; Kobayashi, M. Electrophoretic mobility of nanoparticle aggregates: Independence from aggregate size. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2024**, *703*, 135244.
- (55) Gu, S.; Risse, S.; Lu, Y.; Ballauff, M. Mechanism of the Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Catalyzed by Peroxidase-Like Pt Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes: A Kinetic Study. *ChemPhysChem* **2020**, *21* (5), 450-458.
- (56) Jiang, B.; Duan, D.; Gao, L.; Zhou, M.; Fan, K.; Tang, Y.; Xi, J.; Bi, Y.; Tong, Z.; Gao, G. F.; et al. Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes. *Nature Protocols* **2018**, *13* (7), 1506-1520.
- (57) Bortamuly, R.; Konwar, G.; Boruah, P. K.; Das, M. R.; Mahanta, D.; Saikia, P. CeO₂-PANI-HCl and CeO₂-PANI-PTSA composites: synthesis, characterization, and utilization as supercapacitor electrode materials. *Ionics* **2020**, *26* (11), 5747-5756.
- (58) Zachariah, Z.; Heuberger, M. P.; Espinosa-Marzal, R. M. Colloidal Interactions—DLVO Theory and Beyond. In *One Hundred Years of Colloid Symposia: Looking Back and Looking Forward*, ACS Symposium Series, Vol. 1457; American Chemical Society, 2023; pp 31-47.
- (59) Szilagy, I.; Trefalt, G.; Tiraferri, A.; Maroni, P.; Borkovec, M. Polyelectrolyte adsorption, interparticle forces, and colloidal aggregation. *Soft Matter* **2014**, *10* (15), 2479-2502.
- (60) Chang, Q.; Jiang, J. Adsorption of Block-Polyelectrolytes on an Oppositely Charged Surface. *Macromolecules* **2021**, *54* (9), 4145-4153.
- (61) Forsman, J. Polyelectrolyte Adsorption: Electrostatic Mechanisms and Nonmonotonic Responses to Salt Addition. *Langmuir* **2012**, *28* (11), 5138-5150.
- (62) Fritz, G.; Schädler, V.; Willenbacher, N.; Wagner, N. J. Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. *Langmuir* **2002**, *18* (16), 6381-6390.
- (63) Seyrek, E.; Hierrezuelo, J.; Sadeghpour, A.; Szilagy, I.; Borkovec, M. Molecular mass dependence of adsorbed amount and hydrodynamic thickness of polyelectrolyte layers. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (28), 12716-12719.
- (64) Seibert, E.; Tracy, T. S. Fundamentals of Enzyme Kinetics: Michaelis-Menten and Non-Michaelis-Type (Atypical) Enzyme Kinetics. In *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications*, Nagar, S., Argikar, U. A., Tweedie, D. Eds.; Springer US, 2021; pp 3-27.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Tóth Ágotának, a Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék vezetőjének, hogy biztosította számomra jelen dolgozat elkészítésének lehetőségét a tanszéken.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szilágyi Istvánnak, a támogatását és a lehetőséget, hogy a kutatási munka az MTA-SZTE „Lendület” Biokolloidok Kutatócsoportban készülhetett el.

Köszönöm továbbá Dr. Varga Viktóriának, Péter Tamásnak és Dr. Nizar Alsharifnak a kutatómunka során nyújtott segítségüket.