

TÖBB KOMPONENSŰ NANOKOMPOZITOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS ANTIOXIDÁNS HATÁSUK VIZSGÁLATA KOLLOID RENDSZEREKBEN

Viczián Dániel

Szegedi Radnóti Miklós Kísérleti Gimnázium

12. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Szilágyi István

egyetemi docens

&

Nizar B. Alsharif

doktorandusz hallgató



Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

MTA-SZTE „Lendület” Biokolloidok Kutatócsoport

Lezárva: 2023. január 10.

TARTALOM

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés	3
2. Célkitűzések.....	5
3. Eszközök és módszerek.....	5
3.1. Felhasznált eszközök.....	5
3.2. Felhasznált anyagok.....	6
3.3. Dinamikus fényszórásmérés (DLS)	6
3.4. Elektroforetikus fényszórásmérés (ELS)	7
3.5. UV-Vis spektrofotometria.....	8
3.6. Szuperoxid-dizmutáz teszt	8
3.7. Kataláz teszt	9
4. Eredmények.....	10
4.1. A stabilitást befolyásoló tényezők vizsgálata	10
4.2. A MnNPs funkcionálizálása.....	12
4.3. A PMn immobilizálása.....	13
4.4. A MnO ₂ -alapú rendszerek antioxidáns hatásának vizsgálata	15
4.5. Két nanozyme-ot tartalmazó kompozit létrehozása	17
5. Összegzés	21
6. Felhasznált irodalom	22

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CAT	Kataláz enzim
CCC	Kritikus koaguláltató koncentráció
CeNPs	CeO ₂ nanorészecskék
DLS	Dinamikus fényszórásmérés
DLVO	Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek
EPM	Elektroforetikus mobilitás
ELS	Elektroforetikus fényszórásmérés
HRP	Torma peroxidáz enzim
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
IC ₅₀	50%-os hatást elérő koncentráció
IEP	Izoelektromos pont
MnNPs	MnO ₂ nanorészecskék
PCe	PDADMAC-dal funkcionizált CeNPs
PCe-Mn	PCe és MnNPs által alkotott nanokompozit
PDADMAC	Poli-diallildimetil-ammónium-klorid
PMn	PDADMAC-dal funkcionizált MnNPs
PMn-Ce	PMn és CeNPs által alkotott nanokompozit
ROS	Reaktív oxigén származékok
SL	Szulfát latex
SPMn	SL felületén immobilizált PMn
SOD	Szuperoxid dizmutáz enzim
XO	Xantin oxidáz enzim

1. BEVEZETÉS

Élő organizmusokban mindig megtalálhatók nagy reakciókészségű molekulák és ionok, amelyek potenciálisan károsak lehetnek. Ezek egy csoportját alkotják a reaktív oxigén származékok (ROS). A ROS rendszerint erős oxidálószer, ilyenek például a szabadgyökök (pl.: szuperoxid gyökanion (O_2^-), hidroxilgyökök ($\text{OH}^\cdot$) ...), amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek. Ha szervezetünkben felhalmozódnak, az hosszú távon oxidatív stressz [1] kialakulásához vezethet: reaktivitásuk miatt a sejtekben megtalálható biomolekulák nagy részét képesek károsítani, ezzel bizonyítottan elősegítve például a rosszindulatú daganatok, agyvérzés, illetve szív- és érrendszeri betegségek kialakulását [2,3]. A ROS keletkezése az életfunkciókkal együtt járó folyamat, viszont különféle környezeti hatások, mint például a légszennyezés, káros szenvedélyek (alkoholfogyasztás és dohányzás), élelmiszer-adalékok, gyógyszerek és elektromágneses sugárzás megnövelik koncentrációjukat, ezért elsődleges fontosságú a ROS ártalmatlanítása.

Az élő szervezetben számos antioxidáns hatású molekula (pl.: vitaminok és polifenolok) illetve enzim megtalálható, amelyek képesek hatékonyan ROS-at hatástalanítani redoxireakciókon keresztül. A szuperoxid gyökanionok bomlását például a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim katalizálja, a reakció termékei molekuláris oxigén és peroxidionok (O_2^{2-}). Ez utóbbi iont, amely még mindig igen reaktív, többek között kataláz (CAT) és torma peroxidáz (HRP) enzimek képesek lebontani; H_2O_2 -ből víz és oxigén keletkezik a folyamat során.

Előfordulhat azonban, hogy a szervezetben található enzimek mennyisége nem teszi lehetővé a kívánatos ROS-koncentráció csökkentését, ezek tehát túlsúlyba kerülnek, és oxidatív stressz alakul ki. A megelőzés és kezelés kézenfekvő módja lehetne természetes enzimek szervezetbe juttatása, ez azonban komoly problémákba ütközik. Az enzimek előállítása igen drága, és meglehetősen érzékenyek környezetük változásaira. A pH, a hőmérséklet és az ionerősség optimálistól való eltérése könnyen az enzim aktivitásának részleges vagy teljes elvesztéséhez vezethet. A tudományterületen kutatók fontos feladata tehát olcsóbban, nagyobb mennyiségben előállítható és környezetüknek ellenállóbb, de az enzimet helyettesíteni képes anyagok előállítása és fejlesztése.

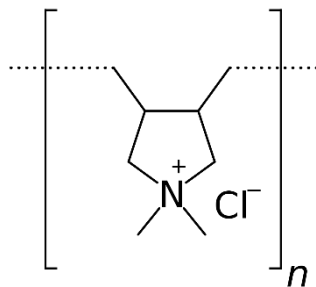
A kutatások célpontjai többek között a nanozyme-ok, amelyek enzimatis aktivitással rendelkező nanorészecskék. Ezeket rendszerint szerkezetileg stabil szervesetlen anyagok építik fel, így szélsőséges körülmények között is képesek katalitikus funkcióik megtartására. Jelentős

fajlagos felületük miatt nagy mennyiségű szubsztrát megkötésére képesek, így ideális alternatívát jelentenek az enzimek helyettesítésére. Antioxidáns aktivitású nanozyme-ok lehetnek például fém nanorészecskék, mint a réz (Cu), az arany (Au) vagy a platina (Pt), de akár fémek vegyületei is, mint a vanádium(V)-pentoxid (V_2O_5), a mangán(IV)-dioxid (MnO_2) vagy a cérium(IV)-dioxid (CeO_2) [4]. Ezek az anyagok alacsony toxicitással, ezáltal megfelelő biokompatibilitással rendelkeznek, így nem csak ipari, de biológiai és orvosi területen is felhasználhatók [4,5]. Nagy a ROS-hoz való affinitásuk, ezáltal hatékonyan láthatják el a természetes enzimek katalitikus feladatait. Előállításuk általában olcsó, fizikai-kémiai tulajdonságaik igény szerint a felhasználási céloknak megfelelően hangolhatóak.

A nanozyme-ok vizes közegben diszpergálva kolloid rendszert képeznek, ennek alacsony stabilitása az egyik legnagyobb hátrányuk. Elektrolitoldatban a kolloidstabilitást több tényező egyszerre határozza meg. Folyamatosan hatnak, ám csak kis távolságban jelentősek, a van der Waals erők, amelyek a részecskék közötti vonzást biztosítják. Taszítás hiányában a részecskék könnyen aggregálódnának elsőként dimereket, később akár csapadékok, fázisszeperációt eredményezve. A részecskék méretének növekedésével csökken a fajlagos felületük, ami jelentős visszaesést eredményez felületi kötőhelyeik számában, ezáltal enzimatis aktivitásukban is. A részecskéken azonban felületi töltések alakulhatnak ki, amelyek függenek azok szerkezetétől és a rendszer pH-jától. Az elektrolit jelenléte nagy mennyiségű oldott iont jelent, amelyek az ellentétes töltésű nanorészecskét körbeveszik, majd az oldatban lévő ellenionjaik egy újabb, külső burkot vonnak köréjük. Így egy elektromos kettősréteget kapunk, amely elektrosztatikus taszítással akadályozza meg az aggregációt. A Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) elmélet írja le a kolloid rendszerek viselkedését e két kölcsönhatás alapján [6,7]. Az ionerősség növekedése olyan tényező, amely gyengíti az elektromos kettősréteg taszítását, ezáltal destabilizálja a rendszert. Ennek megfelelően az aggregáció sebessége egyenletesen nő az ionerősség növelésével a kritikus koagulálható koncentráció (CCC) eléréséig.

A kolloid rendszerek stabilizálhatók például a részecskék immobilizálásával egy megfelelő polimer hordozó felületén vagy egy polielektrolittal történő funkcionizálással. A polielektrolitok olyan polimerek, amelyek monomerjei ionizálható vagy ionos funkciós csoportot tartalmaznak; ilyen például a poli-dialildimetil-ammonium-klorid (PDADMAC), amelynek szerkezete az 1. ábrán látható. Jelenlétük megnövelheti a felületi töltést, ezzel

erősítve meg a DLVO-elmélet szerint létrejövő taszító kölcsönhatásokat az elektromos kettősrétegek átlapolódása által.



1. ábra: A PDADMAC szerkezete

2. CÉLKITŰZÉSEK

A projekt során főbb céljainkat az alábbiak szerint foglalhatjuk össze:

- (i) MnO₂ nanozyme (MnNPs) stabilizálása. Ehhez célul tűztük ki a MnNPs számára megfelelő pH értékek beállítását, majd PDADMAC-dal való funkcionálisítását. Ezután az így előállított PDADMAC-MnNPs (PMn) rendszer szulfát latexen (SL) történő immobilizációja, majd az így kapott kompozit (SPMn) antioxidáns aktivitásának felmérése következhetett.
- (ii) Többfunkciós nanokompozitok előállítása. Vizsgálni szeretnénk volna két nanozyme (MnNPs és cérium-oxid nanorészecskék (CeNPs)) együttes hatását is. Ezt PDADMAC-dal funkcionálisított CeNPs (PCe) előállításával, majd PCe és MnNPs, illetve PMn és CeNPs heteroaggregációjával kívántuk elérni. Végül célunk volt az így kapott nanokompozit rendszerek (rendre PCe-Mn és PMn-Ce) antioxidáns hatásának vizsgálata.

3. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált eszközök

- ALV-NIBS/HPPS fényszórásmérő
- Anton Paar LitesizerTM 500 fényszórásmérő
- GENESYSTM 10S Thermo Fisher Scientific UV-VIS spektrofotométer
- VWR USC-TH szonikáló kád
- WTW inoLab® pH 7310 pH mérő

3.2. Felhasznált anyagok

- foszfát-puffer
- Hellmanex® tisztítófolyadék
- hidrogén-peroxid, H_2O_2 (30%)
- nátrium-hidroxid, NaOH
- nátrium-klorid, NaCl (~99,5%)
- nitro-kék-tetrazolium-klorid (NBT), $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_6$ (90%)
- PDADMAC (200000-350000 M, 20%)
- sósav, HCl (37%)
- Xantin, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$ (99%)
- Xantin oxidáz (XO), $(\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NCl})_n$

A fenti vegyszereket analitikai minőségben szereztük be a VWR és Sigma-Aldrich cégektől, és további tisztítás nélkül kerültek felhasználásra. A SL, MnNPs, CeNPs kolloid rendszerek a befogadó laborban korábban kerültek előállításra kereskedelmi forgalomban elérhető reagensek felhasználásával. A kísérletek elvégzéséhez Puranility TU 3 UV/UF+ víztisztító rendszerrel ionmentesített vizet használtunk.

3.3. Dinamikus fényszórásmérés (DLS)

A DLS a vizsgált részecskék hidrodinamikai sugarát (R_h) adja meg. A méréseket ALV-NIBS/HIPPS készülékkel végeztük, a lézer hullámhossza 638,2 nm, a minták hőmérséklete a mérések ideje alatt $25,0 \pm 0,2$ °C volt, a szórt fényt 173°-nál detektáltuk. A részecskéket polisztirol küvetákban vizsgáltuk 2 ml térfogatban. A mérést közvetlenül a kérdéses nanorészecskék adagolása után kezdtük, és minden esetben egymás után 100-szor ismételtük.

A R_h a Stokes-Einstein egyenlettel (1) számítható [8]:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

ahol k_B a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet Kelvinben kifejezve, η a közeg dinamikai viszkozitása és D a diffúziós együttható.

A kolloid rendszer stabilitását a stabilitási arány (W) írja le [8]:

$$W = \frac{k_{gyors}}{k_{app}} \quad (2)$$

ahol k_{app} a látszólagos aggregációs sebességi állandót, k_{gyors} a diffúzió kontrollált aggregáció sebességi állandóját jelöli. Diffúzió kontrollált aggregáció kellő töménységű sóoldatokban fordul elő, itt az elektromos kettősréteg hatása gyakorlatilag megszűnik, így taszító erők helyett a diffúzió sebessége szab gátat a folyamatnak. Ez azt is jelenti, hogy W értéke nem lehet 1-nél kisebb.

A mérés során kapott adatból (R_h) a következőképpen kapjuk meg k_{app} -t [8]:

$$k_{app} = \frac{1}{R_h(0)} \cdot \frac{dR_h(t)}{dt} \quad (3)$$

ahol $R_h(0)$ a monomer részecskék hidrodinamikai sugara, $\frac{dR_h(t)}{dt}$ a $R_h \sim t$ függvény lineáris illesztésének meredeksége. Minél lassabb tehát az aggregáció (azaz minél kisebb ez a meredekség), annál nagyobb W értéke.

Az aggregációs felezési idő ($T_{1/2}$) alatt a részecskék fele képez dimert [8]:

$$T_{1/2} = \frac{2}{kN_0} \quad (4)$$

ahol k a Smoluchowski-féle aggregációs sebességi állandó, N_0 pedig a kezdeti részecskeszám-koncentráció.

3.4 Elektroforetikus fényszórásmérés (ELS)

Az ELS a vizsgált részecskék elektroforetikus mobilitását (EPM) adja meg. A méréseket Anton Paar Litesizer™ 500 készülékkel végeztük, a lézer hullámhossza 658 nm volt, a feszültséget pedig állandó 200 V értéken tartottuk. A mintákat 8-szor mértük $25 \pm 0,2$ °C hőmérsékleten, majd a mérések átlagát vettük figyelembe. A kapott EPM (μ_e) értékekből a Smoluchowski-modell alapján számoltunk zéta potenciált (ζ) [9]:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (5)$$

ahol ε a közeg relatív permittivitása, ε_0 a vákuum permittivitása. A bemért térfogat mindig egy Anton Paar™ omega küvetta térfogata (350 μ l) volt.

A zéta potenciál pH-függésének mérésekor két 100-100 ppm koncentrációjú diszperziót készítettünk. Ezek pH-ját 3-ra, illetve 11-re állítottuk be, rendre 1,0 M HCl, illetve 1,0 M NaOH oldatok segítségével, majd a köztes pH értékeket e két diszperzió különböző arányú részleteinek összekeverésével kaptuk. A pH változását és pontos értékét WTW inoLab® pH 7310 pH mérővel követtük nyomon.

A zéta potenciál sókoncentráció-függésének mérésekor a vizsgált anyag állandó koncentrációjú diszperzióinak sorozatát készítettük elő. Ezekben az egyenlő térfogatú mintákban változtattuk a NaCl koncentrációját 1 M felső határig.

Az immobilizálás, illetve polielektrolittal való funkcionizálás folyamatait is nyomon követtük ELS-sal. A funkcionizálás során a MnNPs koncentrációját állandó értéken tartottuk, és ehhez képest a PDADMAC tömegarányát (mg/g mértékegységben) változtattuk. Az immobilizálás során a korábban megkapott PMn és az állandó koncentrációban jelen lévő SL arányát változtattuk.

3.5. UV-Vis spektrofotometria

A méréseket GENESYS™ 10S, Thermo Fisher Scientific UV-VIS spektrofotométer felhasználásával végeztük. Az abszorbancia (A) értékekből a fényt elnyelő komponens koncentrációját (c) a Lambert-Beer törvény (6) alapján számoltuk:

$$A = \varepsilon lc \quad (6)$$

ahol l a fény útjának hossza (cm-ben) a mintában, ε pedig a moláris extinkciós együttható.

3.6. Szuperoxid-dizmutáz teszt

A SOD enzimet utánzó antioxidáns hatást a Fridovich-vizsgálattal [11] mértük. Itt a szuperoxid gyökanionokat ($\cdot\text{O}_2^-$) helyben, xantin húgysavvá való oxidálásával termeljük, majd figyeljük, hogy a vizsgált, potenciálisan SOD aktivitással rendelkező anyag képes-e azokat elbontani. A gyökök jelenlétét NBT segítségével követjük nyomon: a NBT eredetileg sárga színe kékre változik, ha gyökanionokkal reakcióba lép. Kevés kék anyag jelenléte tehát hatékony SOD hatású antioxidáns rendszerre utal. A színváltozás spektrofotometriával mérhető.

A mérés során 3000 μL térfogatú mintákat készítettünk elő. Ezekben a vizsgált antioxidáns koncentrációját 0-2 ppm között változtattuk, a pH-t pedig 50 mM koncentrációjú foszfát-puffer segítségével $7,0 \pm 0,1$ -re állítottuk be. Minden mintába tettünk emellett 200 μL 3,0 mM xantint, 300 μL 1,5 g/L XO-t és 100 μL 3,0 mM NBT-t. Az utolsó reagens (a XO)

hozzáadása után a mintát 5 másodpercig erőteljesen kevertettük, majd gyorsan a spektrofotométerbe helyeztük. Itt 565 nm hullámhosszon 6 percig másodpercenként rögzítettük az abszorbanciát. Az antioxidáns nélküli változás értékének a pontosság érdekében 3 mérés átlagát tekintettük. A katalitikus helyek telítettségét százalékban kifejező inhibíciót (I) a következő módon számoltuk:

$$I = \frac{(\Delta A_0 - \Delta A_s) \cdot 100}{\Delta A_0} \quad (7)$$

ahol ΔA_0 az antioxidáns nélküli abszorbancia változások (3 mérés) átlaga, ΔA_s pedig a minta abszorbancia változása a mérési idő alatt. Az antioxidáns koncentrációját $I = 50\%$ esetén IC_{50} -nek nevezzük.

3.7. Kataláz teszt

A CAT enzim a H_2O_2 -ot vízre és oxigénre bontja, az ilyen jellegű antioxidáns hatást a CAT teszttel ellenőrizhetjük. Ennek lényege, hogy különböző mennyiségű H_2O_2 -ot juttatunk azonos koncentrációjú, feltételezetten CAT-aktivitással rendelkező rendszerekbe, majd a H_2O_2 abszorbanciáját UV-Vis spektrofotometriával 240 nm-en nyomon követjük. Méréseink során a 2400 μL térfogatú mintákban a H_2O_2 koncentrációját 0 és 1 mM között változtattuk. A pH-t $7,0 \pm 0,1$ értékre beállító 50 mM foszfát-puffer koncentrációt 600 μL 200 mM-os oldat bemérésével értük el. Az oldatokhoz adtunk még 240 μL 100 ppm koncentrációjú antioxidánst, illetve a mintától függő arányban összesen 1560 μL ioncserélt vizet és H_2O_2 -törzsoldatot. A H_2O_2 bemérése után a mintát 5 s-ig erőteljesen kevertettük, majd gyorsan a spektrofotométerbe helyeztük. Az abszorbanciát 10 percen keresztül másodpercenként rögzítettük, majd a kapott grafikon meredekségéből meghatároztuk a reakciósebességet (s^{-1} , azaz abszorbancia egység/s mértékegységgel), amelyet a Lambert-Beer törvény (6) segítségével mM s^{-1} dimenzióban is megadtunk. A számításhoz az $l = 1$ cm-t (a kűvetta vastagsága) és $\varepsilon = 39,4$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$ adatokat használtuk fel. A reakciósebességet a H_2O_2 koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, majd a kapott adatpontokat a Michaelis-Menten modell (8) alapján illesztettük [10]:

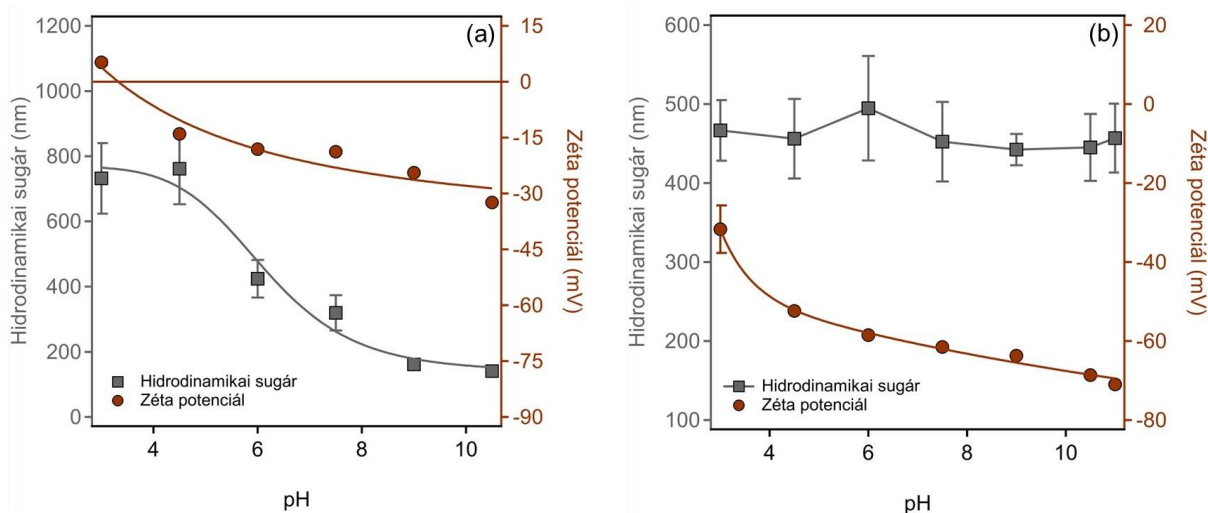
$$v = \frac{v_{max}}{K_M + [S]} \quad (8)$$

ahol v a reakciósebesség, v_{max} a reakciósebesség legnagyobb elérhető értéke, K_M a Michaelis-Menten állandó, $[S]$ pedig a szubsztrát koncentrációja (K_M a $0,5 \cdot v_{max}$ értékhez tartozó koncentrációt adja meg).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A stabilitást befolyásoló tényezők vizsgálata

Elsőként a MnNPs és SL rendszerek töltésének és stabilitásának pH-függését tanulmányoztuk, az eredményeinket a 2. ábra mutatja.

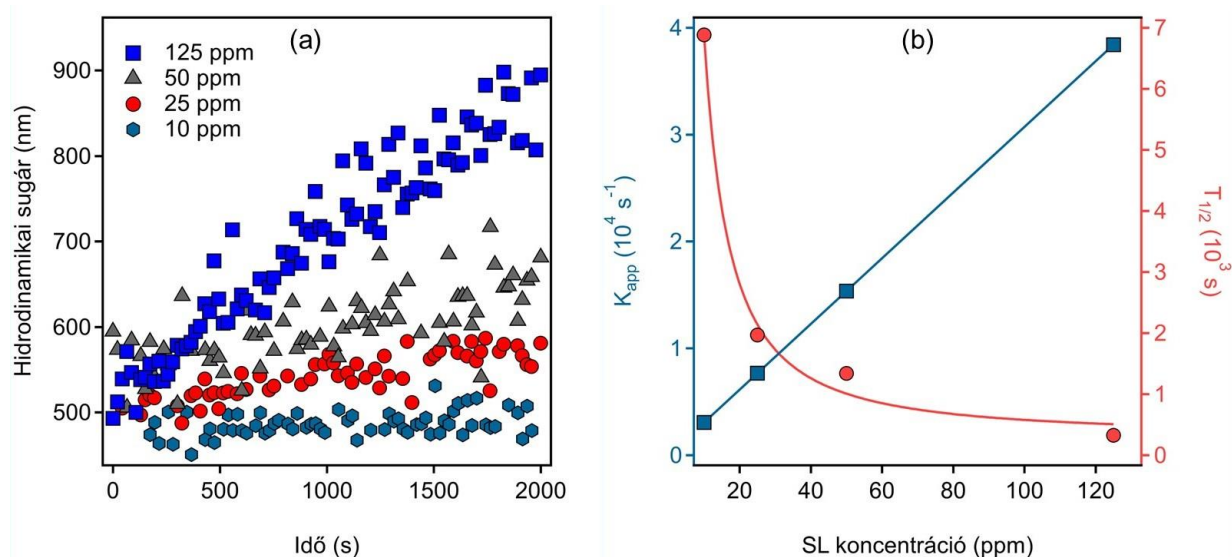


2. ábra: (a) MnNPs hidrodinamikai sugara és zéta potenciálja a pH függvényében. A méréseket 50 ppm MnNPs koncentrációval végeztük. (b) SL részecskék hidrodinamikai sugara és zéta potenciálja a pH függvényében. A méréseket 125 ppm SL koncentrációval végeztük.

A MnNPs savas kémhatásnál közel 0 mV zéta potenciállal rendelkeznek, a felületi hidroxil csoportok protonálódása miatt, ez az érték a pH növekedésével csökken. Hasonló tendenciát mutat a hidrodinamikai sugár is, itt a nagyobb részecskéktől kisebbek felé tolódik a rendszer. Ez a megfigyelés a DLVO-elmélettel magyarázható: az erősebb negatív felületi töltések erősebb elektromos kettősréteg általi taszítást eredményeznek, ezáltal az elektrosztatikus taszítás hatékonyan akadályozza meg az aggregációt, ez pedig kisebb R_h -ú részecskéket eredményez. A 0-hoz közeli zéta potenciál esetén azonban a van der Waals kölcsönhatások meghatározóak, mivel az elektromos kettős réteg általi taszítás megszűnik, és ekkor gyors aggregációt figyelhetünk meg. A méréseinket a pH 3-11 intervallumban végeztük, mindkét vizsgált anyag esetén pH 9-11 között kaptuk a legstabilabb diszperziókat. Ennek oka, hogy a részecskék felületén deprotonálható csoportok helyezkednek el: MnNPs-nél -OH, SL-nél pedig szulfátcsoportok, amelyek nagyobb része a lúgos tartományban deprotonálódik. A SL a mérésben szereplő minden pH érték esetén kellően alacsony zéta potenciállal rendelkezett a stabil rendszer eléréséhez. Ez az információ, a későbbi immobilizálást tekintve, ígéretes hordozónak mutatja a SL részecskéket. A 2. ábra eredményei alapján a vizsgált anyagok

kezeléséhez a továbbiakban pH 9-es közeget választottunk; minden kísérletünket, ahol ennek ellenkezője nincs feltüntetve, ezen a pH értéken végeztünk.

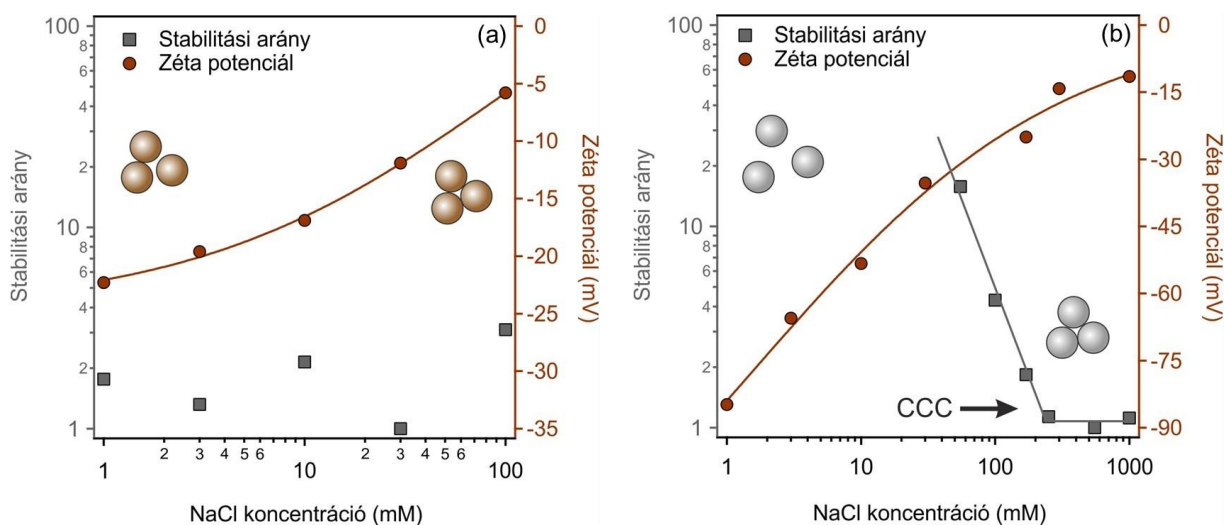
A SL stabilitását a koncentrációjának függvényében is tanulmányoztuk. Az 1 M ionerősséget NaCl hozzáadásával biztosítva a diffúzió kontrollált aggregációt vizsgáltuk. Az eredményeinket a 3. ábra mutatja.



3. ábra: (a) SL részecskék hidrodinamikai sugara az idő függvényében, 10-125 ppm SL koncentrációtartományban, 1 M ionerősség mellett. (b) A látszólagos sebességi állandók és aggregációs felezési idők az SL koncentrációjának függvényében.

A 3/a ábrán látszik, hogy magasabb SL koncentrációknál gyorsabb aggregációt (meredekebb görbét) figyelhetünk meg. A (3) és (4) egyenletek segítségével kiszámítottuk az adott koncentrációkhoz tartozó látszólagos aggregációs állandókat (k_{app}) és az aggregációs felezési időket ($T_{1/2}$), amelyek ugyanezt a tendenciát mutatták (3/b ábra). Magasabb koncentrációhoz nagyobb k_{app} és rövidebb $T_{1/2}$ tartozik, ez szintén gyorsabb aggregációra utal a részecske koncentráció növekedésével. Az eredményeink alapján a további kísérletekben 125 ppm SL koncentrációt használtunk. Ennek oka, hogy a diffúzió kontrollált aggregáció még ennél az értéknél is lineáris növekedést mutat, amely kisebb ionerősség melletti stabilitásra utal. A magasabb koncentrációnál jelentkező erőteljesebb fényszórással pontosabb DLS méréseket tudunk elvégezni.

A stabilitást az ionerősség függvényében is tanulmányoztuk. A mintákhoz egyre növekvő mennyiségű NaCl-ot adtunk, és meghatároztuk a zéta potenciáljukat, illetve stabilitási arányukat, amelyeket a 4. ábrán tüntettünk fel.



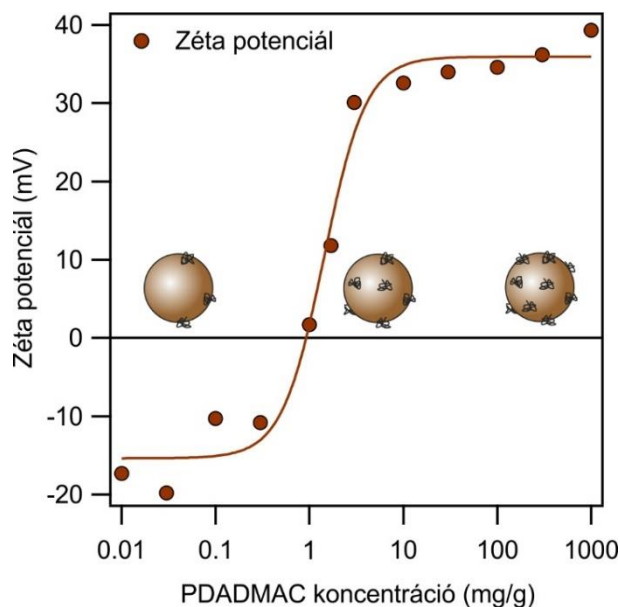
4. ábra: (a) MnNPs stabilitási arányai és zéta potenciáljai a sókoncentráció függvényében. A mérések során a MnNPs koncentrációja 100 ppm volt. (b) SL stabilitási arányai és zéta potenciáljai a sókoncentráció függvényében. A mérések során 125 ppm SL koncentrációt alkalmaztunk.

A stabilitási arányt a (2) és (3) egyenletek alapján számítottuk ki. A MnNPs által alkotott diszperzió nem tudta só jelenlétében megőrizni a stabilitását, így 1-hez közeli értékeket kaptunk. A SL azonban a várt trendet mutatta: a sókoncentráció növekedésével folyamatosan csökkent a stabilitási állandója a 250 mM-nál található CCC-ig, ahonnan pedig már diffúzió kontrollált aggregációra jellemző $W = 1$ értéket kaptunk. A folyamat a DLVO-elmélettel magyarázható: az ionerősség növelése lecsökkentette az elektromos kettősréteg hatását a töltések árnyékolása által, így gyengébbé váltak az aggregációt akadályozó taszító kölcsönhatások. Ezt igazolja a folyamatosan növekvő negatív zéta potenciál érték is.

4.2. A MnNPs funkcionálizálása

A stabilitás jellemzése és a körülmények optimalizálása után a célunk a MnNPs immobilizálása volt a SL felületén. A 2. ábrán azonban látszik, hogy mindkét rendszer zéta potenciálja negatív, így nem jöhet köztük létre elektrosztatikus vonzás. A probléma megoldása érdekében a MnNPs felületét pozitív töltésű polielektrolittal bevontuk így egy pozitív felületi töltést kívánva elérni. Az általunk választott polielektrolit a PDADMAC volt, amelynek

szerkezete az 1. ábrán látható. A stabil, pozitív töltésű diszperzió eléréséhez szükséges PDADMAC mennyiségét az 5. ábra alapján határoztuk meg.

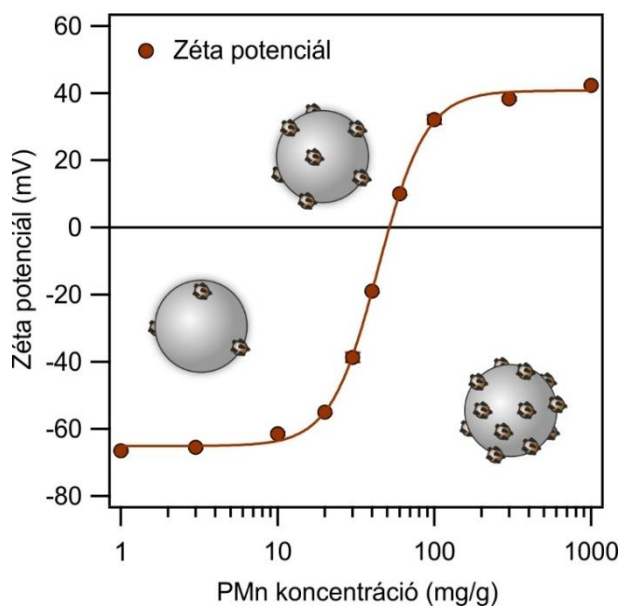


5. ábra: A MnNPs zéta potenciáljai a PDADMAC koncentrációjának függvényében, amelyet mg PDADMAC/g MnNPs egységben adtunk meg. A kísérlet során a MnNPs koncentrációja 100 ppm, a NaCl koncentrációja 1 mM, a pH értéke pedig pH = 9 volt.

Alacsony PDADMAC-koncentráció nem elegendő a töltés előjelének megváltoztatására, itt a MnNPs-re jellemző negatív töltést mérjük. Az izoelekromos pont (IEP) után már többségbe kerül a részecskék felületére kötődő PDADMAC töltése; a felület telítésével együtt a görbe ismét ellaposodik. A nagy, pozitív zéta potenciál értékek a DLVO-elmélet alapján stabil diszperziókat, és az elektrosztatikus vonzás elvei alapján hatékony immobilizálást tesznek lehetővé. Emiatt a továbbiakban felhasznált PMn rendszert jellemző PDADMAC-koncentrációt 200 mg/g-nak választottuk.

4.3. A PMn immobilizálása

A kapott pozitív felületi töltésű PMn részecskéket könnyen tudtuk a negatív felületi töltésű SL részecskéken immobilizálni. Ezzel SL-PDADMAC-MnNPs (SPMn) kompozitot kaptunk. A PMn-koncentráció növelése mellett figyelemmel kísértük a zéta potenciál változását, ennek eredményét a 6. ábra szemlélteti.

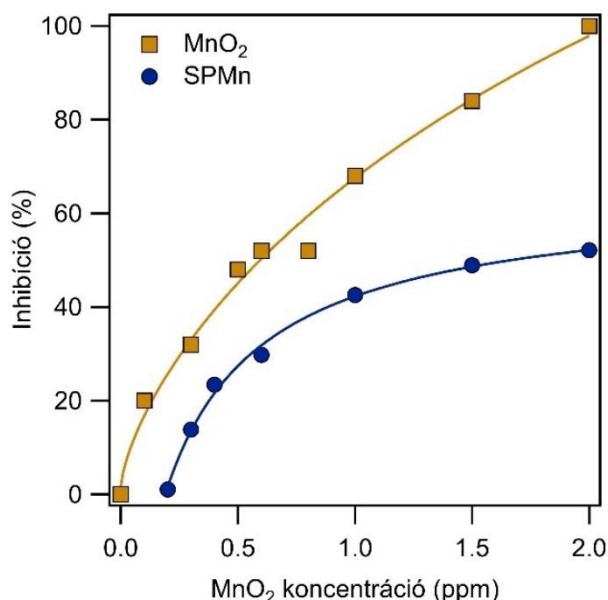


6. ábra: Az SPMn rendszer zéta potenciáljai a PMn mennyiségének függvényében, amelyet mg PMn/g SL egységben adtunk meg. A mérések során a SL koncentrációja 125 ppm volt.

A mérési eredmények alapján a folyamat párhuzamba állítható a funkcionizálással. Alacsony PMn-koncentrációnál a zéta potenciál előjelét a SL részecskék negatív felületi töltése határozza meg, a PMn-koncentráció növelésével azonban annak pozitív töltése kerül előtérbe. Az IEP 50 mg PMn/g SL koncentrációnál található, nagyjából 100 mg/g felett a zéta potenciál jól közelíti a maximális értéket. A célunk stabil antioxidáns hatású rendszer előállítása, így a további kísérletekhez a 100 mg/g koncentrációt választottuk. Ennél a dózisonál valószínűsíthetjük, hogy a képződő SPMn részecskék nagy felületi borítottságúak, stabilis diszperziókat alkotnak és ezáltal hatásos ROS lebontó anyagok lesznek.

4.4. A MnO_2 -alapú rendszerek antioxidáns hatásának vizsgálata

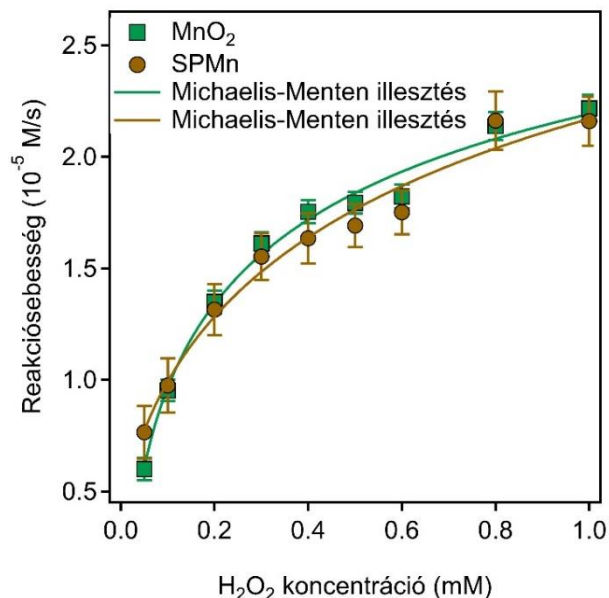
A szuperoxid gyökanionok elbontásának hatékonyságát felmérő SOD tesztet elvégeztük MnNPs -re és SPMn -re is. Az inhibíció (I) értékeket a (7) egyenlet alapján határoztuk meg, az eredményeket a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra: Az inhibíció változása a nanozyme koncentrációjának függvényében MnNPs és SPMn nanozyme-ok esetén.

Mindkét vizsgált rendszer rendelkezik SOD enzimet utánozó aktivitással, a koncentrációjuk növelése a hatékonyságukban is a várt növekedést idézi elő. A 7. ábrán ismertetett mérési adatok alapján a funkcionális és immobilizálás csökkentette ugyan a MnNPs katalitikus aktivitását, de nem szüntette meg, sőt azt mondhatjuk, hogy az SPMn részecskék jelentős szuperoxid gyökanion dizmutáló hatással bírnak. A csökkenés kvantitatívvá tehető az IC_{50} értékek összehasonlításával, amely MnNPs esetén $\text{IC}_{50} = 0,593$ ppm, SPMn esetén pedig $\text{IC}_{50} = 1,665$ ppm. Ezek alapján mindkét rendszer rendelkezik SOD aktivitással, de a MnNPs kisebb mennyisége is elég az 50%-os katalitikus hatás eléréséhez. A kolloidstabilitást növelő hatást is figyelembe véve kijelenthetjük, hogy az SPMn hatékony antioxidánsként alkalmazható heterogén rendszerekben.

Az antioxidáns hatás további igazolásához elvégeztük szintén MnNPs-re és SPMn-re a CAT tesztet is, amely a peroxidionok bontását vizsgálja. A Lambert-Beer törvény (6) segítségével kiszámolt reakciósebességeket a Michaelis-Menten modell (8) alapján illesztettük, és a 8. ábrán tüntettük fel.



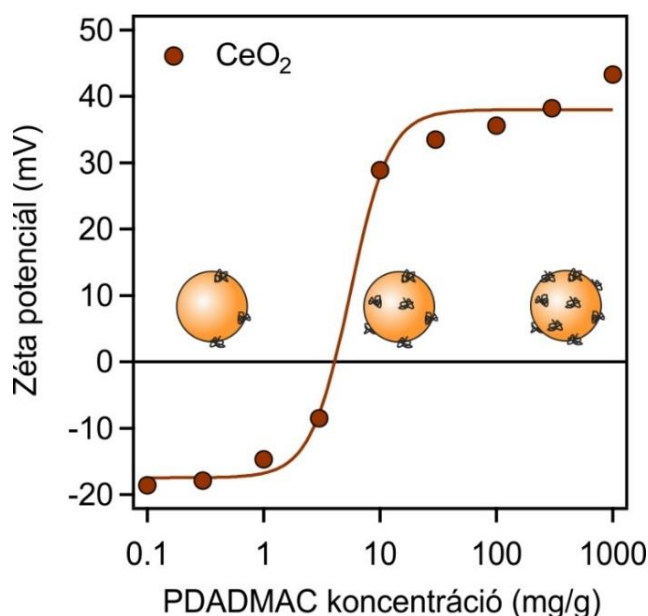
8. ábra: A reakciósebesség változása a H₂O₂ koncentrációjának függvényében MnNPs és SPMn nanozyme-ok esetén. A folytonos vonalak a Michaelis-Menten modell (8) alapján történő matematikai illesztést jelölik.

A reakciósebesség értékei és a matematikai modell pontossága egyértelművé teszik, hogy mindkét vizsgált rendszer rendelkezik CAT-aktivitással. A 8. ábra grafikonjai azt is megmutatják, hogy a MnNPs funkcionálizálása és immobilizálása gyakorlatilag nem csökkentett a hatékonyságán. A Michaelis-Menten modell (8) két paramétere a MnNPs esetén $v_{\max} = 2.5049 \pm 0.083 \mu\text{M s}^{-1}$ és $K_M = 0.17094 \pm 0.0191 \text{ mM}$, SPMn esetén pedig $v_{\max} = 2.348 \pm 0.136 \mu\text{M s}^{-1}$ és $K_M = 0.14696 \pm 0.0308 \text{ mM}$. Ez további bizonyítékot ad a 8. ábrán láthatóan hasonló mértékű CAT aktivitásra. Ezen információk alapján kimondhatjuk, hogy az immobilizálás nem változtatta meg lényegesen a nanozyme részecskék H₂O₂-elbontóképességét.

Az eddigi eredmények összességében bizonyították, hogy sikeresen állítottunk elő egy MnNPs alapú, CAT és SOD aktivitással rendelkező, stabil kolloid rendszert.

4.5. Két nanozyme-ot tartalmazó kompozit létrehozása

A kutatási projekt következő lépése olyan nanokompozit létrehozása volt, amely CeO_2 nanorészecskéket (CeNPs) és MnNPs-et is tartalmaz. Célunk a ROS lebontás során szinergisztikus hatás létrehozása volt, amely által széles spektrumú antioxidáns anyagot hozhatunk létre. A közvetlen heteroaggregáció ismét az azonos előjelű töltések problémájába ütközik: a CeNPs-nek is negatív a zéta potenciálja az alkalmazott kísérleti körülmények között. A megoldást itt is az egyik rendszer PDADMAC-kal való funkcionálizálása jelentette, amely pozitív zéta potenciállal rendelkező nanozyme-ot eredményezett. Ehhez előzetes mérésenként CeNPs-re is elvégeztük a már ismert eljárást a megfelelő PDADMAC-koncentráció megtalálására, és eredményeinket a 9. ábrán tüntettük fel.

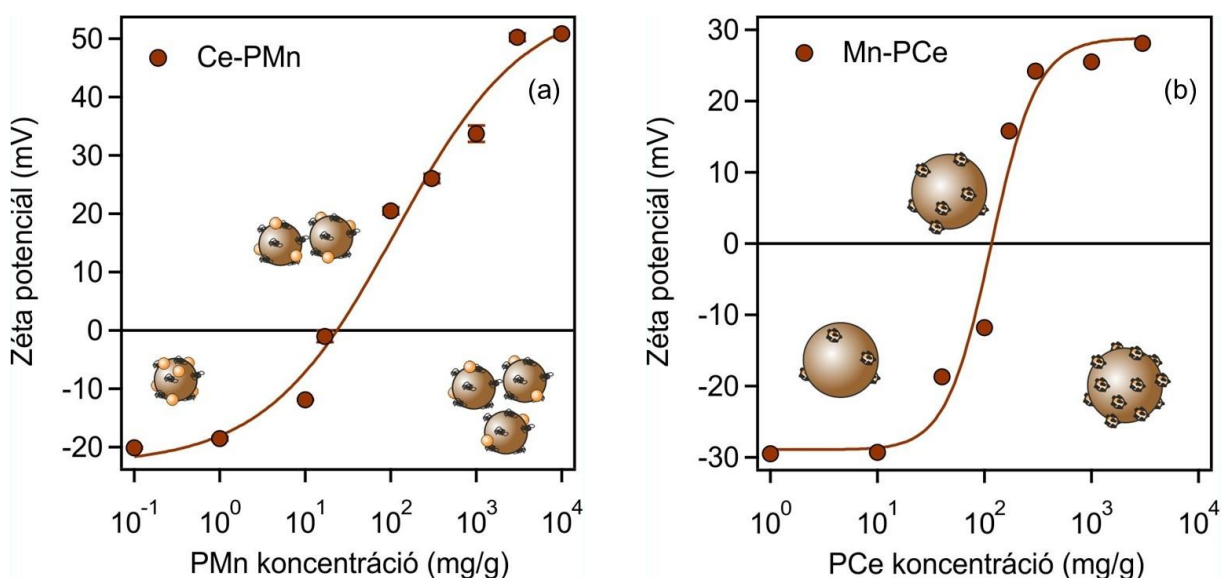


9. ábra: A CeNPs zéta potenciáljai a PDADMAC koncentrációjának függvényében, amelyet mg PDADMAC/g CeNPs egységben adtunk meg. A kísérlet során a CeNPs koncentrációja 100 ppm, a NaCl koncentrációja 1 mM, a pH értéke pedig pH = 9 volt.

A tapasztaltak kvalitatívan megegyeznek a MnNPs-nél látottakkal: alacsony polielektrolit-koncentráció esetén a CeNPs negatív zéta potenciált határoznak meg, majd nagyobb PDADMAC-koncentráció hatására a zéta potenciál előjele megváltozik, stabil pozitív töltésű diszperziót kapunk a polielektrolit-adszorpció hatására. A zéta potenciál és stabilitás közti összefüggést itt is a DLVO-elmélet írja le: a felületi töltés elektromos kettősréteget hoz létre, amely elektrosztatikus taszítással akadályozza az aggregációt. A nagyobb töltés erősebb taszítást, ezáltal lassabb aggregációt jelent, illetve teljesen meggátolja a részecskék összetapadását ütközésük során. Az eredmények alapján a továbbiakban 80 mg PDADMAC/g

CeNPs koncentrációt használtuk fel a CeNPs-PDADMAC (PCe) rendszerek előállításához és vizsgálatához.

A zéta potenciál előjelének szükséges megváltoztatása tehát sikeres volt, rendelkezésünkre álltak negatív töltésű MnNPs és CeNPs, illetve pozitív töltésű PMn és PCe rendszerek. Ezekből elektrosztatikus vonzáson alapuló heteroaggregációval kétféle kompozitot tudunk előállítani: CeNPs és PMn segítségével a PMn-Ce, illetve MnNPs és PCe segítségével pedig a PCe-Mn rendszereket kaphatjuk. Mindkét esetben vizsgáltuk a zéta potenciált a két komponens arányának függvényében (10. ábra). A PDADMAC-dal funkcionizált komponens mennyiségét változtattuk a negatív töltésű nanozyme állandó koncentrációja mellett, tehát a zéta potenciál megváltozása a kompozit kialakulásának következménye.

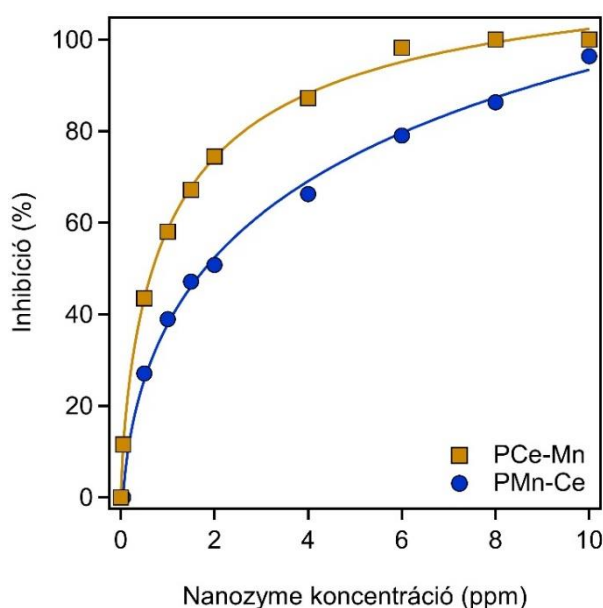


10. ábra: (a) PMn-Ce rendszer zéta potenciálja a PMn koncentrációjának függvényében, amelyet mg PMn/g CeNPs egységben adtuk meg. (b) PCe-Mn rendszer zéta potenciálja a PCe koncentrációjának függvényében, amelyet mg PCe/g MnNPs egységben adtuk meg. A kísérletek során a pH = 9 érték állandó volt.

A mérések ismét a várt eredményt mutatták, azaz a funkcionizált nanozyme alacsony koncentrációban nem volt képes a rendszer negatív töltését kompenzálni, a koncentráció növekedésével azonban a töltés folyamatosan nőtt. Mindkét kompozit esetén elértük azt a koncentrációt, amikor a heteroaggregáció teljesen lejár szódik, azaz további funkcionizált részecskének már nincs lehetőségük megkötődni. Ekkor, nagy pozitív töltés esetén a DLVO-elmélet szerint stabil rendszert kaptunk, amely mind MnNPs-t és CeNPs-t tartalmaz. Stabil, pozitív töltésű kompozitok kezelése és vizsgálata érdekében a 10. ábrán szereplő adatok alapján

a PMn-Ce és PCe-Mn rendszereknél is 1000 mg/g koncentrációval, azaz 1:1 tömegarányal dolgoztunk tovább. Fontos megjegyezni azonban, hogy míg ez az arány a PCe-Mn rendszerénél telítettséget jelent az EPM-ban, addig a másik esetben az EPM növekedett nagyobb dózisoknál, azaz nem alakult ki egységes kompozit szerkezet ennél az anyagnál.

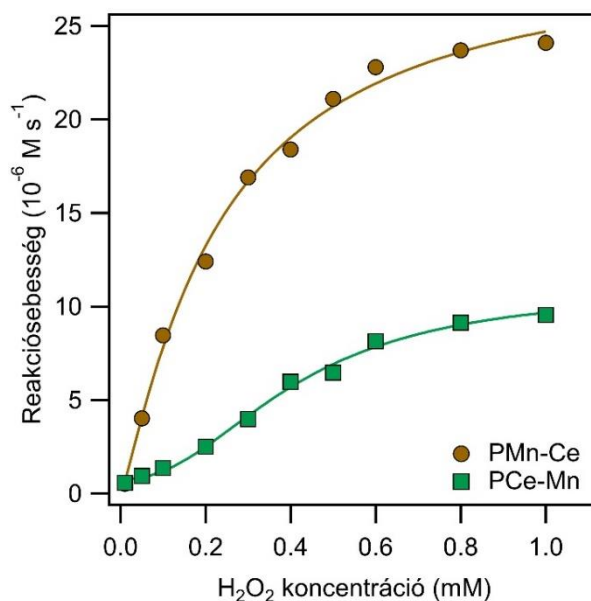
Mértük a két kompozit SOD aktivitását, a SOD teszt segítségével. Az inhibíciót a (7) egyenlet alapján számítottuk ki, a kapott értékeket a részecskék koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, ezt a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra: Az inhibíció változása az antioxidáns koncentrációjának függvényében PCe-Mn és PMn-Ce kompozitok esetén.

Mindkét nanokompozit egyértelműen rendelkezik SOD aktivitással. Az IC_{50} értékekben lényeges különbséget tapasztaltunk, a PCe-Mn rendszeré $IC_{50} = 0,703$ ppm, a PMn-Ce rendszeré pedig $IC_{50} = 1,800$ ppm. Ez utóbbi tehát jóval nagyobb mennyiségű nanozyme esetén éri el ugyanazt az 50%-os hatékonyságot. A 7. és 11. ábrák, valamint az IC_{50} értékek alapján a PCe-Mn SOD aktivitása a MnNPs-ével, míg a PMn-Ce aktivitása a SPMn-ével összemérhető. Ez azt jelenti, hogy a heteroaggregáció nem szüntette meg, sőt csak a PMn-Ce esetén csökkentette jelentős mértékben a nanozyme-ok SOD hatását.

A kompozitok antioxidáns aktivitását a CAT teszttel is vizsgáltuk. A mért abszorbancia (A) – idő (t) függvényekből a meredekségeik és a Lambert-Beer törvény (6) segítségével reakciósebességet számoltunk, amelyet a H_2O_2 koncentrációjának függvényében ábrázolva a 12. ábrán tüntettünk fel.



12. ábra: A reakciósebesség változása a H₂O₂ koncentrációjának függvényében. A rendszer nem funkcionizált nanozyme-ra vonatkoztatott koncentrációja mindkét kísérletben 50 ppm volt.

Az ábrán látható, hogy a két rendszernél jelentős mértékben különböző CAT-aktivitást mértünk. Ez számszerűen a PMn-Ce kompozit esetén $v_{\max} = 32.467 \pm 1.28 \mu\text{M s}^{-1}$ és $K_M = 0.29399 \pm 0.0306 \text{ mM}$, a PCe-Mn kompozit esetén pedig $v_{\max} = 22.578 \pm 4.41 \mu\text{M s}^{-1}$ és $K_M = 1.2335 \pm 0.368 \text{ mM}$ értékekkel jeleníthető meg. Ez is igazolja, hogy a PMn-Ce kompozit rendelkezik hatékonyabb CAT aktivitással, hiszen nagyobb maximális reakciósebességet képes elérni, és a $v_{\max}$ felének eléréséhez szükséges koncentrációja lényegesen kisebb a PCe-Mn rendszerénél. A kisebb SOD aktivitással bíró PMn-Ce rendszer CAT aktivitás terén tehát felülmúlta a PCe-Mn rendszert.

5. ÖSSZEGZÉS

Kutatási munkánk során MnO_2 alapú antioxidáns hatású kolloid rendszerek fejlesztésével foglalkoztunk.

Megvizsgáltuk a SL és MnNPs rendszerek stabilitását a pH és ionerősség függvényében a hidrodinamikai sugár, a zéta potenciál és a stabilitási arány mérésével. Ehhez DLS és ELS módszereket alkalmaztunk. A SL rendszert koncentrációja függvényében is jellemeztük látszólagos sebességi állandóinak és aggregációs felezési időinek segítségével.

Az eredményeink alapján kiválasztott optimális körülmények között sikerült a SL és MnNPs rendszerekből kompozitot képezni. Ehhez elsőként a töltés megváltoztatása érdekében a MnNPs-et PDADMAC polielektrolittal funkcionalizáltuk. A kapott pozitív töltésű PMn rendszer és a negatív töltésű SL részecskék heteroaggregációjával SPMn nanokompozithoz jutottunk. Ez a MnNPs-nél jóval nagyobb stabilitással rendelkezett, de SOD és CAT aktivitása nem szűnt meg. Ezt UV-Vis spektrofotometria segítségével, a SOD és CAT tesztek elvégzésével igazoltuk.

Egy másik antioxidáns hatású nanozyme-ot, a CeO_2 -ot is tanulmányoztuk. A CeNPs negatív töltése miatt ezt is funkcionalizáltuk PDADMAC-dal, amely a pozitív töltésű PCe rendszert eredményezte. Ez lehetőséget teremtett két nanokompozit, a PMn-Ce és a PCe-Mn előállítására. Mindkét esetben sikerült jelentős kolloidstabilitással rendelkező diszperziókat létrehozunk, amelyek a SOD és CAT teszten is bizonyították a korábban vizsgált rendszerekével összemérhető antioxidáns hatásukat.

Az elért eredmények fontos információkat szolgáltatnak olyan antioxidáns kompozitok kifejlesztésében érdekelt kutatásokhoz, ahol heterogén mintákban használható széles spektrumú ROS lebontó anyagok létrehozása a cél.

6. FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] A.A. Vernekar, D. Sinha, S. Srivastava, P.U. Paramasivam, P. D'Silva, G. Mugesh, An antioxidant nanozyme that uncovers the cytoprotective potential of vanadia nanowires, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5301.
- [2] Y.Q. Wang, L.L. Li, W.B. Zhao, Y. Dou, H.J. An, H. Tao, X.Q. Xu, Y. Jia, S. Lu, J.X. Zhang, H.Y. Hu, Targeted therapy of atherosclerosis by a broad spectrum reactive oxygen species scavenging nanoparticle with intrinsic anti-inflammatory activity, *ACS Nano* 12(9) (2018) 8943-8960.
- [3] M.C. Liu, S.J. Yang, D. Hong, J.P. Yang, M. Liu, Y. Lin, C.H. Huang, C.J. Wang, A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrosylates. *Chem. Cent. J.* 10 (2016) 39.
- [4] R.Z. Tian, J.Y. Xu, Q.A. Luo, C.X. Hou, J.Q. Liu, Rational design and biological application of antioxidant nanozymes, *Front. Chem.* 8 (2021) 831.
- [5] M. Moglianetti, E. De Luca, P.A. Deborah, R. Marotta, T. Catelani, B. Sartori, H. Amenitsch, S.F. Retta, P.P. Pompa, Platinum nanozymes recover cellular ROS homeostasis in an oxidative stress-mediated disease model, *Nanoscale* 8(6) (2016) 3739-3752.
- [6] B. Vincent, Early (pre-DLVO) studies of particle aggregation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 170(1-2) (2012) 56-67.
- [7] B. Derjaguin, A theory of interaction of particles in presence of electric double-layers and the stability of lyophobic colloids and disperse systems, *Prog. Surf. Sci.* 43(1-4) (1993) 1-14.
- [8] H. Holthoff, S.U. Egelhaaf, M. Borkovec, P. Schurtenberger, H. Sticher, Coagulation rate measurements of colloidal particles by simultaneous static and dynamic light scattering, *Langmuir* 12(23) (1996) 5541-5549.
- [9] A.V. Delgado, F. Gonzalez-Caballero, R.J. Hunter, L.K. Koopal, J. Lyklema, Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena, *J. Colloid Interface Sci.*, 309(2) (2007) 5046-5051.
- [10] K.A. Johnson, R.S. Goody, The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten paper, *Biochemistry* 50(39) (2011) 8264-8269.
- [11] W. Zhang, S.L. Hu, J.J. Yin, W.W. He, W. Lu, M. Ma, N. Gu, Y. Zhang, Prussian Blue nanoparticles as multienzyme mimetics and reactive oxygen species scavengers, *J. A. Chem. Soc.* 138(18) (2016) 5860-5865.