

Válasz Prof. Dr. Kellermayer Miklós az „Interferometrikus optikai hullámvezető bioszenzor jelölésmentes érzékeléshez” című doktori értekezésre adott bírálatára

1. Szabotossága és alapossága ellenére a bevezető fejezeteket olvasva olyan impresszió alakulhat ki az olvasóban, hogy a bioszenzorika kimerül biomolekulák nagy érzékenységgű (alacsony koncentrációk mennyiségek) detektálásában. Mindazonáltal feltétlenül ide tartoznak azon törekvések, amelyek a mind pontosabb és nagyobb időfelbontású in vivo lokalizációt célozzák, és azok is, amelyek nem anyagmennyiséget mérnek, hanem erőtereket (pl. elektromos térerőt, mechanikai erőt) detektálnak.

A bírálónak teljes mértékben igaza van akkor, amikor kifogásolja, hogy a dolgozat a bioérzékelés tudományterületének csupán egyetlen szeletére tér ki. Ennek oka egyfelől az, hogy a dolgozat terjedelme korlátozott, másfelől, hogy a disszertáció megértéséhez és a tézispontban megjelölt eredmények *status artis*-ban történő elhelyezéséhez ezek nem feltétlenül szükségesek. A korrektség megőrzése érdekében igyekeztem a „1. Bevezetés” című fejezet első mondatában úgy fogalmazni, hogy az „elmúlt évtizedek egyik fő kutatási iránya” kapott hangsúlyt a dolgozatban. Azonban mindenképpen ki kellett volna térnem valóban legalább a példák szintjén azokra a törekvésekre is, melyeket a bíráló hiányolt a bevezetésből. Sajnálom, hogy ezek kimaradtak a végleges változatból.

2. Ellipszometriás mérések:

-32. oldal: A pszi és delta változók definíciója a szövegből nem, csak a lábjegyzetből derül ki. A lábjegyzetben egyenletben, bár négyzetes középhiba, nincs négyzetes tag.

Mindkét észrevétel jogos kritika. A definíció eredetileg megelőzte a pszi és delta változók első használatát, azonban „Az ellipszometria” című alfejezet függelékbe emelése után, elmulasztottam elhelyezni a szövegben a megfelelő helyre mutató hivatkozást. A négyzetes középhiba lábjegyzetbeni definíciójában a belső zárójelről pedig lemaradt a négyzetjel. Sajnálattal vettem tudomást e hibákról.

-33. oldal: a törésmutató mérés pontossága a harmadik tizedesig terjed. Ez ellentmondásban áll a 27. oldalon szereplő érzékenység adatoknak. Mi a magyarázat?

Az ellentmondás feloldható, ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy – még az emberi tényezők kizárása esetén is – egy eszköz mérési pontosságát – az optimálistól eltérő irányban – jelentősen befolyásolhatják a vizsgált minta tulajdonságai (például a hordozó, a vékonyrétegek és a környezet rendszerének optikai jellemzői, a vékonyrétegek homogenitása, a határfelületek minősége) is. A közelítésekre épülő, így nem tökéletes optikai modellek csak tovább növelik az ellipszometriai görbék kiértékelése során kapott paraméterértékek bizonytalanságát. Mindezek természetes következményeként a mérés hibája a gyakorlatban mindig rosszabb az eszközre optimalizált etalon mintákon mérhető adatoknál. A dolgozatban ezt elmulasztottam kifejteni, azonban a hibák értékét figyelembe véve, fizikailag indokoltabbnak láttam a paraméter-értékeket csupán három tizedes jegy pontosságig megadni.

-34. oldal: Érdemes lett volna néhány mondatban értelmezni a spektrumokat és azt, hogy hogyan jutott a jelölt a leírt következtetésre (i.e., tallium-oxid amorf).

Az ellipszometriai görbék klasszikus értelemben vett kiértékelése gyakran nem megoldható feladat, mert jellegüket rendkívül összetett módon, optikai paraméterek sora befolyásolja. Ennek következménye, hogy bár Paul Drude már 1889-ben javasolta mérési módszernek, az ellipszometria csupán a számítástechnika fejlődésével, a nagy számítási kapacitású személyi számítógépek megjelenésével terjedhetett el. A „spektrumok értelmezése” tehát a dolgozatban, mint a „spektrumok számítógépes kiértékelése és az így kapott paraméter-értékekből történő következtetések levonása” kapott helyet. Ilyen nézőpontból szemlélve igyekeztem alapos magyarázatot adni a disszertációban felvetett kérdésekre.

-35-36. oldal: Meg lehet-e becsülni az APTES illetve a GA felületi sűrűségét? Történt-e felületi szaturáció ezen vegyületekre nézve?

Legjobb tudomásom szerint, önmagában spektroszkópai ellipszométerrel még nem végeztek olyan mérést, mellyel közvetlenül meghatározható lett volna az APTES és GA rétegek felületi sűrűsége. Más módszerekkel, pl.: kvarc kristály mikromérleg - spektroszkópai ellipszometria kombinált berendezéssel, ahol a leválasztott anyag térfogata mellett egyben annak tömege is meghatározható, a sűrűség adatok mérhetőek lennének. A dolgozatban bemutatott ellipszometriás és rácsosított interferométeres mérések alapján e mennyiségeket csupán akkor becsülhetjük meg, ha az APTES és GA rétegek effektív törésmutatóját, illetve a hozzájuk tartozó dn/dc értékeket ismertnek feltételezzük.

A „8. 4. Nagy felbontású kísérletek rácsosított interferométerrel” című alfejezet 8.4.2.-1.-es ábrája igazolja, hogy GA esetén a telítődés 10 percen belül bekövetkezik. Az APTES rétegek esetére hasonlóan egyértelmű mérést mi magunk nem végeztünk, azonban a szaturációra a 6.1.2.-4-es ábrából indirekt módon következtethetünk, vagy szakirodalmi adatokra támaszkodhatunk (tekintsük példának a disszertáció 65. és a benne felsorolt hivatkozások tartalmát).

-38. oldal: Az ureával történő kezelés után változatlan flagelláris filamentum rétegvastagság miatt bizonyítja a kovalens felületi kötődést? Nem az lett volna a várt eredmény, hogy a flagellinek jelentős része disszociál a felületről, hiszen maga a flagellum nem kovalens polimer? Különösen azon flagellumok esetén kifejezett ez a hatás, amelyek nem az oldalukra fekve kötődtek a felületre.

Bár a bíráló felvetése teljesen jogos, hiszen oldatban a kezelés valóban okozhatja a flagelláris filamentumok depolimerizációját, a hordozóra leválasztott fehérjék esetére a dolgozatban megjegyzésként hivatkozott vizsgálatok mégis nagyfokú ellenállóságot mutattak ki. Fontos megjegyezni, hogy e kísérletek elvégzésük idején – technikai okokból – még nem épülhettek a finom részleteket feltárni képes folyadékcélás mérésekre, így a jelenség magyarázatát nem adhatták meg. A fehérje vékonyrétegek stabilitásának mélyrehatóbb vizsgálatát például *in situ* ellipszometriás mérések teszik lehetővé, mert ezekkel a réteg változásai nagy pontossággal és nagy mintavételezési frekvenciával követhetők nyomon. A kérdést részleteiben vizsgálni próbáló első kísérletek közül egyet a disszertációhoz szorosan nem kapcsolódó, benne [T14]-es sorszámmal hivatkozott kézirat mutat be. E folyóirataikk hetedik ábrája alapján, a fehérjerétegen mért, detergenses mosás hatására bekövetkező delta ellipszometriai paraméter érték mérési hibába olvadó változásából a réteg ellenállóságára következtethetünk.

Bízunk benne, hogy jól megtervezett, szisztematikus folyadékcélás mérésekkel a

későbbiekben világos magyarázatot adhatunk majd a megfigyeltekre.

-39. oldal: A nagyfelbontású Woollam ellipszométer beszerzésének hosszas - fél oldalnyi - részletezése csökkenti a tudományos színvonalat, ugyanis az eszközbeszerzés nem tudományos eredmény.

Köszönöm a kritikát. A jövőben igyekezni fogok majd az ilyen és hasonló hibákat elkerülni.

-41. oldal: Csupán itt vált világossá az olvasó számára, hogy a flagellin mérések levegőben történtek. A szárítás hogyan befolyásolja a flagellumok szerkezetét?

Ahogy arra a bíráló kérdésével rátapintott, a szárítás valóban nem tartozik az olyan beavatkozások körébe, melyek nem módosítják a minta felszínét, a vizsgált paraméterek értékét. A szárítás nagyfokú körütekintést és szakértelmet kíván, hogy a fehérje szerkezetének módosulása, depolimerizációja, mechanikai hatások okozta töredezése, leválása, a felület szennyeződése, stb. ne, vagy csak elhanyagolható mértékben következzen be. Ha technikailag megoldható, hogy ilyen és hasonló kísérleteket cellában végezzünk, ki tudjuk védeni a szárítás gyakran durva mellékhatásait. Ennek megfelelően a disszertáció az első érdemi fejezet második felétől már cellában végzett mérési eredményeket ismertet.

-45. oldal: A 6.2.2.-2/b ábrából leginkább az tűnik ki, hogy az EMA alrétegek számának 3 fölé növelése nem eredményez jelentős javulást az illesztésben. Ezt támasztja alá a 6.2.2.-3/b ábra is, ahol a negyedik alrétegre vonatkozó függvény alig mutat változást. Ezen az ábrán az exponenciálisnak tűnő függvények sebességi állandójában van-e különbség? Nem lehetne ebből a szerkezeti homogenításra következtetni?

Bár valóban nem eredményezi a háromnál több EMA alréteg alkalmazása az MSE jelentős javulást, két fontos tényező mégis indokolja a nagyobb alrétegszámot: 1.) a megfelelő jellemzés érdekében négy vagy több alréteget érdemes használnunk, mert az alrétegek számának növelésével a mért rétegvastagság egy határozott értékhez konvergál. 2.) a kiértékelést követő matematikai vizsgálat alapját mind az öt plusz egy alrétegből származó hat tömegsűrűség érték képzí. Amennyiben kevesebb alréteget alkalmaznánk, a modell egyenletrendszere alulhatározottá válna, nem lenne elegendő ismert paraméterértékünk az egyértelmű megoldás megadásához. Megjegyzendő, hogy amennyiben még több alréteggel tudnánk jellemezni a rendszert, még bonyolultabb modelleket is alkalmazhatnánk a flagelláris filamentumokból felépülő rétegszerkezetek *in situ* vizsgálatára.

A görbékre illesztett exponenciális függvények időállandói között számottevő eltérés tapasztalható. Ezek a felülettől távolodva, azaz az alacsonyabb számú rétegektől a nagyobbak felé haladva egyre csökkennek (≈ 79 , ≈ 47 , ≈ 54 , és ≈ 30 perc).

Homogén fehérjerétegre akkor következtethetnénk a kiértékelésből nyert adatok alapján, ha az alrétegek tömegsűrűség értékei egymással hibahatáron belül rendre egyeznének. Jelen kísérletben ez nem teljesül: növekvő alrétegszám sorrendben jellegzetes csökkenést figyelhetünk meg a tömegsűrűség értékekben. Ennek alapján az inhomogén rétegszerkezetet tartanám valószínűbbnek.

-6.2.1. egyenlet: A dn/dc valóban állandó mennyiségként kezelendő?

De Feijter és munkatársai az 1978-ban közzétett cikkükben arról számolnak be, hogy Abbe refraktométeres méréseikkel a foszfát pufferben oldott lizozim (≈ 15 kDa), bovin szérum albumin (≈ 67 kDa), β -laktoglobulin (≈ 18 kDa) és ovalbumin (≈ 43 kDa) fehérjék esetén is a

dn/dc arányszámra rendre $\approx 0.18 \text{ cm}^3/\text{g}$ -os értéket kaptak.

Bár igaznak semmiképp sem tekinthető, ha ezen mérési eredményt általánosítani próbáljuk, a gyakorlatban azonban számos cikkben alkalmazzák ezt az értéket a kísérletek elemzése során. Ennek oka főként az, hogy segítségével a vastagság és törésmutató értékek ismeretében, a De Feijter formulát alkalmazva a fehérjeleválasztás folyamatának egyik legfontosabb jellemzőjére, a felületi tömegsűrűsége mások mérésével is összevethető becslést kapunk.

Kifejezetten flagelláris filamentumokra vonatkozó eredmény a szakirodalomban legjobb tudomásom szerint mindmáig nem ismert. Munkatársaim elindították e kérdéskör ellipszometriás vizsgálatát, azonban az első eredményekre még várunk kell.

Mindazonáltal, a bíráló kérdése lényeglátó módon rámutat a dolgozat egyik hiányosságára, mely szerint a dn/dc mennyiség alkalmazását nem készítettem elő megfelelően.

-6.2.2.-4 ábra: Az AFM képek az időfüggő mérések mely szakaszában készültek? A nem aktivált felületre való leválasztás függvénye érdekes eltérést mutat az aktivált felülethez képest: szigmoid görbét láthatunk. Fellép-e kooperativitás ebben a kötődési folyamatban? A felület öblítése még a telítődés előtt megtörtént. Lehet-e telíteni akár az aktivált, akár a nemaktivált felületet? Hasonló össztömeg-sűrűség adódik-e ezekben az esetekben?

Elmulasztottam jelezni a dolgozatban, hogy az AFM képek a leválasztást követően készültek.

A bíráló által felvetett kérdések nagyon fontosak és érdekesek, azonban ezekre a válaszokat sajnálatos módon többnyire még nem tudom. Bár a doktori iskola és az MFA kutatócsoportjaiban e jelenségek vizsgálatát már megkezdjük, kutatásaink még nem jutottak el odáig, hogy egyértelmű magyarázatokkal szolgálhassunk. Bízunk benne, hogy összehangolt és fókuszált munkával mielőbb választ adhatunk a fenti kérdésekre.

-48-53. oldal: Vitatható a flagellumok hossz-eloszlásának monodiszperz Gauss jellege, mert azt a polimerizáció-depolimerizáció folyamatai mellett a lánc-törések és a nem-random konformációs állapotok (pl. helix) is befolyásolják. A modell-görbék (6.2.3.-1. ábra) összességében nem reprodukálják a szaturációs kísérleti görbéket. Az lett volna a természetes, ha ekkor a jelölt elveti a modellt. Egyáltalán, a flagellum-hossz és felületi eloszlás kísérletesen (elsősorban morfológiai módszerekkel) mérhető paraméterek. A flagellum-hossz eloszlásra vonatkozó bonyolult elméleti modellek helyett talán egyszerűbb lett volna itt a kísérlet.

A flagelláris filamentumok hossz-eloszlásának monodiszperz Gauss jellege valóban vitatható, s még indirekt módon sem tekinthető bizonyítottnak. A bírálónak ebben teljes mértékben igaza is van. Mivel azonban olyan közvetlen (*in situ*) mérési eljárást, mellyel az ostorok hossz-eloszlása hiteles érdemi módon meghatározható, az általunk elérhető mérőberendezések között még nem találtunk, csupán érveket hozhattam fel amellett, hogy miért éppen ezen eloszlást tartom valószínűnek.

A megoldás azonban matematikai értelemben visszaadja a mért értékeket. A kísérleti görbék és a szimuláció eltérése mindvégig igen csekély. A belőlük levonható következtetések tehát, ha a kezdeti feltevések helyesek, meg kell állják a helyüket.

3. Rácscsatolt interferometria – refraktometria

-7.1-1. ábra: Az ábrából nem világos, hogy az optikai útba helyezett utolsó tükör miért féligáteresztő.

A Mach-Zender interferométerekben általában a másodosodik féligáteresztő tükör szerepe az, hogy az eszközből kilépő nyalábok intenzitása azonos legyen. Mivel a rácscsatolt interferométer esetén erre valóban nem lenne szükség, sőt az egyenlőtlen intenzitáseloszlást még előnyünkre is tudnánk fordítani, a kérdés mindenképpen jogos. A választ azonban nem az elvi síkon, sokkal inkább a gyakorlati megvalósítás korlátozó tényezői között kell keresnünk. A 7.1.-1.-es ábra, hogy az érzékelés mechanizmusát kivehetően bemutathassa, enyhén torzít. A valóságban a két nyaláb távolsága, a hullámvezető film minőségétől függően, csupán néhány milliméter, így ahhoz, hogy egyik sugármenetet se akadályozzák az alkatrészek peremei, befogói, finomszabályzói, kénytelenek voltunk féligáteresztő tükröt alkalmazni.

-60. oldal: Mi volt az oka annak, hogy fázismodulációra folyadékkristályt alkalmaztak? Mi magyarázza a négyzögimpulzusok használatát folyamatos szinuszos moduláció helyett?

Olyan műszert kívántunk létrehozni, mely egyszerű és kis költségigényű alkatrészekből épül fel, emellett a nagyobb mérési pontosság, továbbá a műszer méreteinek későbbi csökkenthetősége érdekében fontosnak tartottuk, hogy kizárólag statikus alkatrészekből hozzuk létre az érzékelőt. Mindezek szellemében, lehetőségeinket is figyelembe véve, a folyadékkristály modulátorok mellett döntöttünk.

A folyadékkristály modulátorok nemlineáris optikai elemek, így vezérlésük során számos nehézségbe ütközünk: Állandó elektromos tér hatására a folyadékkristályok exponenciálisan csökkenő sebességgel rendeződnek az új egyensúlyi helyzetükbe. A gerjesztés és a relaxáció folyamatai dinamikájukat tekintve eltérnek. Továbbá, nem megfelelő vezérlés hatására a modulátor károsodik. Így tetszőleges, például szinuszos fázismodulációt csak nagy nehézségek árán és csupán megközelítőleg tudnánk megvalósítani. Következésképpen a legegyszerűbb vezérlést tartottuk a leghatékonyabbnak. A vezérlő elektromágneses mező periodikus ki- és bekapcsolása esetén a mért fázistolás egy rendkívül jól reprodukálható telítődési folyamat következménye, melynek dinamikája már egy néhány paraméteres egyenlettel is kiválóan közelíthető.

-63. oldal, 7.6.-1. ábra: Az ábrából az tűnik ki, hogy nem csupán fáziseltolódás lép fel, hanem a lecsengési időállandóban is bekövetkezik változás. Ez mivel magyarázható?

Az exponenciális változások az emberi szem számára szokatlanok, így a görbék ránézésre félrevezetőek lehetnek. A modellegyenletet az említett ábra mérési eredményeire illesztve, a lecsengési időkben csupán a rendszer bizonytalanságának megfelelő különbséget kapjuk vissza.

4. Rácscsatolt interferometria - bioszenzorikai alkalmazás

-81-83. oldal: A biotin kimosását követően érdekes jelcsökkenés lép fel. Bár a jelölt elzárkózik a magyarázattól, a jel alakjából bizonyos feltételezéseket lehet tenni, ugyanis a biotin-kimosás utáni jel az avidin-jel szintje alá csökken. Lehetséges ezért például, hogy amint a 8.4.2.-2/b betétábra sugallja, maga az avidin is részleges kimosásra kerül?

Az említett folyamat megalapozott magyarázatához számos és igen körültekintő mérésre lenne még szükségünk. Ezek hiányában, ahogy a bíráló is írja, csupán feltételezéseket tehetünk. Ezek közül az egyik lehetséges ok valóban az, hogy még az avidin molekulák immobilizációja ellenére is vannak olyan gyengébben kötöttek, melyek az érkező biotinek hatására leválnak a felületről. Ugyanakkor egy másik lehetséges interpretáció lehet az is, melyet Dr. Vonderviszt Ferenc professzor úr vetett fel, hogy az avidin molekulák – a biotinbekötődés hatására – konformáció-változást szenvednek, mely egyébként okozhatja a mért jel ilyen irányú megváltozását is.

5. Rácscsatolt interferométer - ellipszométer kombináció

-89. oldal: A két módszer kombinációja legfeljebb kiegészítő jellegű, és az érzékenység nem növekedett (9.2.-1. ábra). Mik a kombinált módszer igazi előnyei ennek tükrében?

A kombinált módszer előnyei közé valóban nem sorolható, hogy a rácscsatolt interferométerrel, illetve a spektroszkópiai ellipszométerrel külön-külön elérhető mérési érzékenység a kombináció során javul. Az elrendezés olyan kísérletekben mutathat új eredményekre, melyek esetén a két műszer által egyetlen mintán, egy időben és azonos pontban mért, egymást kiegészítő információk összességére van szükségünk a biztos lábakon álló interpretációhoz. Az ellipszometria a spektrális információra építve bonyolult optikai modellek alkalmazásával információban gazdag kiértékelést tesz lehetővé, míg az interferometria a nagyobb érzékenysége miatt a finom jelenségek kimutatását biztosítja. Mindezek mellett fontos előnynek tekinthető a mért adatok jobb értelmezhetősége, a szélesebb körű alkalmazhatóság és az is, hogy a két módszer együttesével elkülöníthetőek a felülethez közeli és felülettől távolabb bekövetkező változások. További előny, hogy a két módszer kombinálása egymás ellenőrzésére, kalibrációjára is használható.

Köszönettel és tisztelettel:



Kozma Péter
doktorjelölt

Budapest, 2011. november 4.