

Válasz Dr. Budai Judit „Biomolecules, polymers and living cells on titanium oxide-based nanostructured coatings: exploitation of label-free optical sensing methods” címmel benyújtott doktori értekezésem bírálatára

Köszönöm Dr. Budai Juditnak dolgozatom alapos átolvasását és részletes bírálatát. Megjegyzéseit elfogadom, kérdéseire pedig az alábbiakban válaszolok:

1. 20. Oldalon a felületi plazmon rezonancia szenzorok kapcsán írja a jelölt: „This method is based on the phenomenon, that when a conductor/dielectric material interface is illuminated by a light beam with specific wavelength in a specific angle, resonant oscillation of conduction band electrons occurs on the surface.”

Kérdésem: A plazmonokat gerjesztő fény polarizációs állapota tetszőleges lehet? Kérem, röviden ismertesse a felületi plazmonok fénnel történő gerjesztéséhez szükséges feltételeket.

A plazmonokat (plazmon polaritonokat) gerjesztő fény polarizációja nem lehet tetszőleges, mert csak a beesési síkkal párhuzamos, vagyis p-polarizációjú hullám tud plazmonokat gerjeszteni. Az SPR-alapú vizsgálatoknál p-polarizációjú beeső fényt használnak, és a reflektált fény intenzitásváltozását vizsgálják. Az ellipszometriával kombinált SPR-nél viszont az információt a beesési síkkal párhuzamos és az arra merőleges polarizációjú komponensek amplitúdó-arányainak, illetve fáziskülönbségeinek megváltozása adja, így ebben az esetben szükséges mindkét polarizációt vizsgálni.

Felületi plazmonok gerjesztésének feltételei:

- A gerjesztőfénynek legyen p polarizációjú komponense. (Ha felírjuk a hullámegyenletet, és a felületre lokalizált megoldásokat keressük, akkor csak abban az esetben kapunk a triviálistól (térerősségek amplitúdója 0) eltérő megoldásokat, ha p polarizációjú fénnel világítjuk meg a felületet.)
- A gerjesztési fény hullámszámvektorának x irányú komponense (k_x) egyezzen meg a fém felületén gerjesztett plazmonhoz tartozó $k_{plazmon}$ hullámszámvektorral, amelynek értékét a Maxwell-egyenletekből lehet levezetni [L.Novotny, B. Hecht: Principles of nano-optics, Ch.12., Cambridge, November 2012]:

$$k_x = k_{plazmon} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\bar{\epsilon}_{Au} \epsilon_{víz}}{\bar{\epsilon}_{Au} + \epsilon_{víz}}}$$

ahol $k_x = n_{BK7} \cdot \omega / c \cdot \sin \theta$, n_{BK7} a prizma anyagának törésmutatója, ω / c a fény vákuumbeli hullámszámvektora, θ a beesési szög, $\bar{\epsilon}_{Au}$ és $\epsilon_{víz}$ az arany és a víz dielektromos állandója. Amennyiben a megfelelő dielektrikum (pl. BK7 üveg) helyett vákuumon/levegőn keresztül érkezik a fény a határfelületre, akkor a közeg hullámszámvektora nem teljesíti a fenti feltételt, és nem valósul meg a plazmongerjesztés.

- Az arany dielektromos állandójának képzetes része sokkal kisebb legyen, mint a valós rész abszolútértéke, így a plazmon úthossza kellően nagy lesz a felület mentén:

$$\text{Im}\{\bar{\epsilon}_{Au}\} \ll |\text{Re}\{\bar{\epsilon}_{Au}\}|.$$

Ez alapján $\text{Im}\{\bar{\epsilon}_{Au}\}$ elhanyagolható.

- Szükséges, hogy a hullámszámvektor folyadékfázis felé mutató normális komponense képzetes legyen. Ennek feltétele, hogy a

$$\bar{k}_{v\acute{u}z,z} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_{v\acute{u}z}^2}{\bar{\epsilon}_{Au} + \epsilon_{v\acute{u}z}}}$$

egyenletben a gyök alatti tört nevezőjében az összeg negatív legyen.
A fenti egyenletekből levezethető, hogy:

$$\text{Re}\{\bar{\epsilon}_{Au}\}\epsilon_{v\acute{u}z} < 0 \quad \text{és} \quad \text{Re}\{\bar{\epsilon}_{Au}\} + \epsilon_{v\acute{u}z} < 0.$$

2. A 38. oldalon azt írja a jelölt, hogy a titanát nanocső rétegek AFM méréséhez szükséges volt a rétegeket üveglemezre is felvinni, ugyanakkor az 5.1. ábrán OWL chipre és az ellipszometriához használt Si hordozóra felvitt titanát nanocső rétegek AFM képe is látható. **Mi indokolta az üveglemezre felvitt rétegeket? Ezek az 59. oldalon megemlített fedőlemezre felvitt rétegek, amelyek a digitális holografikus mikroszkópos mérésekhez tartoznak?**

Köszönöm a megjegyzést, valóban nem volt szerencsés a megfogalmazás. Az üvegszeleteken történtek a mikroszkópos sejtkitapadásos kísérletek, illetve a holomonitoros mérések is.

3. A 45. oldalon írja a jelölt: „The direct light which is not deviated by the object goes through the phase-altering pattern of the phase plate which modifies the wavelength. Those rays that pass through the object structures with different refractive index are deviated, and cross the part the phase-plate that is not covered by the phase altering pattern, therefore the wavelength remains the same as for the incident light. Eventually the difference of the wavelengths will improve the contrast of the image and makes the object clearly visible.” Szerencsés lett volna kicsit bővebben leírni, hogy a fázismódosító mintázatban fellépő hullámhosszváltozás következtében az azon áthaladó és nem áthaladó fény mely tulajdonságában fog eltérni. **Ennek megfelelően, kérem, mutassa be a fáziskontraszt mikroszkópban a fázislemez szerepét.**

Ha a vizsgált mintában eltérő törésmutatójú alkotórészek vannak, akkor a rajtuk áthaladó fénysugarak fázisa eltolódik egymáshoz képest.

Az optikailag sűrűbb, vagyis nagyobb törésmutatójú részen áthaladó fénysugár késni fog a kisebb törésmutatójú részen áthaladó sugárhoz képest. Az útkülönbség a hullámhossz kb. $1/4\lambda$ -e, azaz kb. $1/4\lambda$ -nyi lesz, ami szabad szemmel nem érzékelhető, de ha további $1/4\lambda$ -nyi fázistolást hajtunk végre rajta, akkor az összesen $1/2\lambda$ -nyi eltolódás jól érzékelhető interferenciát okoz.

Ezt úgy lehet megvalósítani, hogy a mintára egy gyűrű alakban fényátersztő, de azon belül és kívül fényzáró tulajdonságú lemezen keresztül érkezik a megvilágító fény, kúppalást alakban. Az objektív felett található a fázislemez, amin szintén gyűrű alakban rápárologtatott réteget tartalmazó lemez van, ami a palást mentén jövő direkt fénysugarat gyengíti, illetve világos kontraszt esetén $+1/4\lambda$ -nyi, sötét kontraszt esetén $-1/4\lambda$ -nyi fázistolást okoz.

Sötét kontraszt esetén a nagyobb törésmutatójú részekhez tartozó késő hullámok további késést szenvednek, így fázisuk kb. $1/2\lambda$ -nyival fog eltérni a szórt nyalábokétól, vagyis az ellentétes fázisuk miatt kioltás következik be, és jelentősen csökken az intenzitásuk. A környezetüknél kisebb törésmutatójú pontoknál fázissietés következik be, amit a fázisgyűrű kompenzál, így az ott áthaladó fénysugár a szórt nyalábbal körülbelül azonos fázisban érkezik. Interferenciájuk erősítést eredményez, ezért ezeknek a pontoknak a képe lesz a legvilágosabb.

Világos kontraszt esetén a nagyobb törésmutatójú pontok fáziskésését kompenzálja a fázis lemez, és a kisebb törésmutatójú pontokhoz tartozó hullámokat tolja a teljes kioltás felé. Így a nagyobb törésmutatójú objektumok képe a környezetüknél világosabb lesz, míg a kisebb törésmutatójú pontok képe az átlagos törésmutatójúakéhoz képest sötétebb lesz.

Ennek eredménye, hogy a mikroszkópban a minta különböző törésmutatójú részei jól elkülöníthetők egymástól.

4. A titanát nanocső rétegek ellipszometriai kiértékelése során (52. oldal) a rétegek vastagsága 9-13 nm-nek adódott. A modellezéshez egy 5 alrétegből álló, lineáris gradienst feltételező modellt használt a jelölt. A titanát nanocsövek átmérőjéről a korábbi fejezetekben azt olvashatjuk, hogy azok 4-7 nm átmérőűek. Ez alapján a réteg 2-3 sorban tartalmazza a titanát nanocsöveket. **Próbálta-e a jelölt az ellipszometriai kiértékelés során alkalmazott gradiens réteg alrétegeinek számát ennek megfelelően megadni? Mi indokolta az 5 alrétegre bontást?**

A nanocsövek méreteloszlása és az AFM-es képek alapján is feltételezzük, hogy a csövek nem rendezetten helyezkednek el egymáson. Egy részük a felszínen fekszik vízszintesen, egyesek viszont a felszínre teljesen merőlegesen helyezkednek el, a legtöbb pedig e kettő közötti ferde állapotban lehet. Emiatt a rétegek száma is változatosan alakulhat.

Az illesztés minősége többnyire javult a rétegek számának növelésével, azonban néhány mérési pontban (valószínűleg a nem pontosan lineáris mélységfüggés miatt), kevesebb (3-4) réteg esetén lett legkisebb az MSE. Ezt anomális jelenségnek értékeltem, emiatt azt a legalacsonyabb rétegszámot választottam, amely fölött már nem csökkent tovább az MSE. Mivel rétegszámtól függetlenül egyetlen illesztett paraméterem volt (a mélységbeli változás lineáris gradiense), ezért a nagyobb rétegszám alkalmazásával nem nőtt az illesztett paraméterek közötti korreláció.

5. A 5.3 b) ábra alapján (53. oldal) az ellipszometriai illesztések a titanát nanocső rétegek szélén leromlott. **Véleménye szerint ennek mi lehetett az oka? A modell szerkezet finomításával pontosítható lett volna-e a kiértékelés ezen – a chipek szempontjából kevésbé releváns – tartományon is?**

A minta szélén maga a réteg is rosszabb minőségű lehet a felpörgetés (spincoating) következtében, ezeken a részeken nagyobb lehet a laterális és a vertikális inhomogenitás is.

A vertikális inhomogenitás okozta hibán lehetséges javítani a modellszerkezet finomításával, vagyis több réteg alkalmazásával. A laterális inhomogenitás okozta hibát pedig a mérő fényfolt leszűkítésével, vagyis fókuszált nyaláb alkalmazásával lehet csökkenteni.

6. 53. oldalon előre utal a 64. oldalon található képletre, ami nem szerencsés. Célszerűbb lett volna a használt ellipszometriai modelleket korábban, pl. a 4. Anyagok és módszerek fejezetben bemutatni.

Köszönöm a megjegyzést, valóban megfelelőbb és könnyebben követhető lett volna úgy.

7. Az éretlen csontképző sejtek OWLS vizsgálata kimutatta, hogy a sejtek adhéziója 30%-kal megnőtt a TNT-vel borított szenzorok esetén. Ennek kapcsán, az 59. oldalon megemlíti a jelölt, hogy ez alapján a titanát nanocsövek alkotta rétegek alkalmazása implantátumokon ígéretes lehet a szövetek regenerációjának szempontjából. A rétegek implantátumon történő alkalmazása szempontjából fontos, hogy maguk a rétegek jól tapadjanak az implantátumra. **Mit tapasztalt a jelölt a rétegek tapadásával kapcsolatban, esetleg készültek-e olyan vizsgálatok, amelyek a TNT rétegek tapadási tulajdonságait vizsgálták?**

Tapasztalataim szerint az *in situ* adszorpció mérések során, ahol 1 $\mu\text{L/s}$ körüli sebességgel áramoltattam az oldatokat a nanorészecskés rétegek vastagsága nem változott. Ez az áramlási sebesség nagyságrendileg megegyezik az emberi szervezetben található áramlási rendszerek sebességével.

Viszont az OWLS chipek tisztítása közben a krómkénsavban történő áztatás során a rétegek gyakran sérültek, és néhány alkalom után már nem borította egybefüggő TNT réteg a chipeket. Az utólag készített AFM-es felvételek is ezt mutatták. Ennek következtében egy réteget csak egy méréshez tudtam felhasználni.

Természetesen a nanocsövek implantátumokon való alkalmazásához szükség lenne többek között a csövek tapadási tulajdonságainak részletesebb vizsgálatára.

8. **Miért tért át az újfejlesztésű ellipszométeres eljárással végzett kísérletek során a nanocsövek alkotta rétegekről a nanorészecskék alkotta rétegekre?**

A nanorészecskéket egy külső partnertől kaptuk és az ő kérése volt, hogy a gömb alakú nanoszemcsékkel is végezzünk kísérleteket. Továbbá a Kretschmann elrendezésben végzett *in situ* mérések kiértékelésnél kihasználhattuk, hogy ez a réteg egyszerűbben modellezhető, mint a nanocsövekből álló.

9. A kifejlesztett ellipszometriai módszer nagy előnye, hogy a mérések mind a referencia felületen, mind a titánoxid gömbökkel borított felületeken azonos körülmények között, majdhogynem szimultán történnek. Ez a tény azt sugallja, hogy a kiértékelés során lehetőség van a kétféle mérőssor egyidejű kiértékelésére ún. „multisample” módszer segítségével, ahol a rétegek optikai tulajdonságait csatolva lehet illeszteni, feltételezve, hogy azok ugyanazok a kétféle hordozón. Ez módszer az illesztés bizonytalanságát nagymértékben tudja csökkenteni. **Mi a véleménye, tapasztalata a jelöltnek, alkalmazható-e ez a kiértékelési eljárás ebben az esetben, hozzájárulhat-e ez a módszer a kiértékelés pontosságának, stabilitásának növekedéséhez?**

Mivel az aranyra meghatározott referencia dielektromos függvény jól modellezte a kísérletben alkalmazott aranyrétegeket, és a rétegek homogenitása megfelelő volt, ezért nem volt szükséges a dielektromos függvény illesztése.

A multisample módszer alkalmazása abban az esetben különösen előnyös, ha kevés paraméterrel leírható a hordozó diszperziója, és sok független minta áll rendelkezésre. Jelen esetben az arany diszperzióját sokparaméteres B-spline modellel közelítettem. Az illesztés így megbízhatóbb volt az adszorbeált réteget még nem tartalmazó, tiszta hordozók esetében, mivel mérésekkel ellenőriztem, hogy a hordozók diszperziója mintáról mintára és mérési pozícióról mérési pozícióra nagy pontossággal megegyezett.

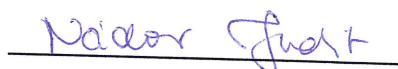
Mivel a „többszörös” méréseket 2 pontban végeztem, ebben az esetben a multisample módszer alkalmazása nem javította volna számottevően a kiértékelés pontosságát. Az adott helyen különböző időpontokban mért spektrumok multisample módszerrel való kiértékelése növelhette volna a pontosságot, de ezt az eljárást a szoftver sajnos nem támogatja.

10. **A puffer oldat törésmutatójának meghatározása pontosan hogyan történt?** A 66. oldal alapján irodalmi adatokat használt a jelölt (The refractive index of the buffer were modeled by fitting Sellmeier's dispersion equation (Eq. (10)) to Palik's data [229].), míg 36. oldal alapján legalább egy hullámhosszon közvetlenül mérte azokat (The refractive indices of the buffer and protein solutions were determined by a full automatic Rudolph J157 refractometer in order to use them in the evaluation process of the OWLS and ellipsometric measurements.) **Hogy viszonyul a mért és az irodalmi adat egymáshoz?**

A refraktométerrel mért törésmutató értékeket egyrészt az OWLS mérésekhez és kiértékelésekhez használt *Biosense 2.8* és *3.0* programokban használtam fel bemeneti paraméterként, másrészt az ellipszometriai *CompleteEase* program adatbázisában található modellek kiválasztására, illetve ellenőrzésére használtam.

Általam mért (632.8 nm-es hullámhosszon): 1.3323
CompleteEase adatbázis (632.8 nm-es hullámhossznál): 1.3318
Az értékek jó egyezést mutatnak (a különbség: 5×10^{-4}).

Budapest, 2016. 09. 30.



Nádor Judit