

GLÜKÓZ-OXIDÁZ ALAPÚ ELEKTRÓDOK ALKALMAZÁSA ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN

- mikroenzimelektród fejlesztésével -

Szabó Evelin
PTE ÁOK
2022

Témavezetők:

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet:

- Prof. Dr. Zelena Dóra
- Péliné Dr. Kovács Anita

Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Fizikai
Kémia és Anyagtudományi Tanszék:

- Dr. Nagy Géza
- Dr. Nagyné Dr. Zengő Livia



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Kémiai Intézet



Tartalomjegyzék

ABSZTRAKT	- 3 -
CÉLKITŰZÉS	- 4 -
BEVEZETÉS – elektródok a hétköznapijainkban	- 5 -
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	- 6 -
BIOSZENZOR DEFINÍCIÓJA	- 6 -
A MÚLT KEZDETE: 1906.....	- 6 -
GLÜKÓZ-SZENZOROK	- 7 -
Az OPTIMÁLIS ELEKTRÓDMÉRET	- 9 -
MÉRÉST ZAVARÓ TÉNYEZŐK KIKÜSZÖBÖLÉSE.....	- 9 -
A VÁRHATÓ GLÜKÓZ-KONCENTRÁCIÓ	- 10 -
Enzimkinetika	- 10 -
Enzim-immobilizációs technikák.....	- 12 -
MÓDSZEREK	- 13 -
ELEKTRÓDKÉSZÍTÉS	- 13 -
MÉRÉSI LEHETŐSÉGEK.....	- 13 -
SZELEKTIVITÁS BIZTOSÍTÁSA	- 16 -
ENZIMRÉTEG.....	- 21 -
MEGOLDÁSOK ÖSSZEFOGLALÁSA	- 22 -
KALIBRÁCIÓS MÉRÉSEK EREDMÉNYEI	- 23 -
NAGYOBB ELEKTRÓD ENZIMRÉTEGÉNEK KÉSZÍTÉSE AKRILLAL	- 24 -
NAGYOBB ELEKTRÓD ALBUMINOS GÉLLEL KÉSZÍTETT ENZIMRÉTEGE	- 25 -
MIKROELEKTRÓDOK	- 27 -
IN VIVO GLÜKÓZ MÉRÉSEK GYÁRI SENZORRAL	- 31 -
ÁLLATKÍSÉRLETES PRÓBAMÉRÉSEK EREDMÉNYEI	- 33 -
ÁLLATOK KEZELÉSE	- 33 -
AZ ÁLLATKÍSÉRLET SORÁN MEGVÁLASZOLANDÓ KÉRDÉSEK	- 33 -
TOVÁBBI TERVEK	- 36 -
ÖSSZEFOGLALÁS	- 37 -
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	- 38 -
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	- 39 -
ÁBRÁK JEGYZÉKE	- 40 -
TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	- 41 -
HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	- 42 -

ABSZTRAKT

Az agyban zajló metabolikus folyamatok nagy időfelbontással történő mérése nagyon fontos a működés megértése szempontjából. Kutatásunk központjában a poszttraumás stressz zavar (PTSD – posttraumatic stress disorder) áll, mely egy stresszhez kapcsolt pszichiátriai betegség. Napjainkban egyre több beteget diagnosztizálnak PTSD-vel, így a háttérben álló mechanizmusok pontos megértése, feltérképezése kiemelt fontosságú. Leggyakrabban 3 agyterületet, a prefrontális kérget (PFC), az amigdalát és a hippokampuszt hozzák összefüggésbe a betegséggel (Török et al., 2019), amik közül mi a PFC-re tervezünk koncentrálni, mivel ez a döntéshozásért felelős kiemelt régió és kutatásának nagy hagyományai vannak a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvosi Kar, Élettani Intézetében. Többek között glükóz transzporter 2-vel (GLUT2) jellemezhető glükóz monitorozó sejteket azonosítottak ezen a területen ((Szabó et al., 2018), (Nagy et al., 2016)). Hosszútávú célunk, hogy igazoljuk a PTSD-szerű tünetek megjelenése összefügg a PFC cukorháztartásának felborulásával. Hipotézisünk szerint a lokális energetikai viszonyok befolyásolása segíthet kivédeni a hosszútávú pszichés tünetek kialakulását.

Ennek a célnak az eléréséhez agyi glükóz szintek mérésére alkalmas szenzort fejlesztettünk a PTE Természettudományi Karának Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékével együttműködve. Saját készítésű és gyári szenzorokat is használunk. Az elkészült szenzorokat- kalibrálás után- kísérleti állatokon teszteltük, annak bizonyítására, hogy eszközünk élő rendszerekben is alkalmas lesz mérések elvégzésére. szabályokat. Állatkísérleteinkben amperometriás méréseket végzünk

Kutatásunk - hosszabb távon - hozzájárulhat a PTSD metabolikus vonatkozásainak megértéséhez, mely segíthet a PTSD terápiájának hatékonyabbá tételében. A PTE két karának együttműködésével távlati célunk, hogy a kutatásban beállított módszert más modellekben, más enzimmel is alkalmazzuk. Ezzel új nézőpontot adhatunk a preklinikai kutatásoknak egy nagy időfelbontású, valós idejű mérést lehetővé tevő módszer bevezetésével.

CÉLKITÚZÉS

Patkány agyban történő mérésre alkalmas glükóz-oxidáz alapú amperometriás bioszenzor készítése és alkalmazása.

Hosszútávú célom a poszttraumás stresszavar (PTSD) patkánymodellben a beállított módszerrel patkányagy prefrontális cortexben (PFC) spontán vagy manipulációk hatására (glükóz terhelés, inzulin adás) kialakuló glükóz-szintek mérése. Jelen pályamunkában egy év előkészítő munkáját foglaltam össze, mely során a célnak megfelelő bioszenzort készítettem.

BEVEZETÉS – elektródok a hétköznapijainkban

Az elektrokémia talán a legkevésbé ismert ága a kémiának a hétköznapi ember számára. Még a gimnáziumi emelt szintű kémiai oktatás sem tér ki rá részletesebben, aki pedig nem olyan irányban tanul tovább, ahol fizikai kémiát oktatnak, nincs is lehetősége a témával találkozni, foglalkozni a továbbiakban.

Ennek ellenére mindennapjainkban számos elektródot és elektrokémiai elven működő mérőeszközt használunk. Alapvető tartozéknak számít a pH mérő szinte minden laborban (vagy akár azok otthonában, akik komolyabban foglalkoznak akvarisztikával). Ez egy hidrogénionra szelektív üveg membránelektrodot tartalmaz és a potenciometria elvén működik.

Egészségügyben vérvételeknél az egyik leggyakrabban kért paraméter a különböző ionszintek (nátrium, kálium). Ezek meghatározhatóak lángfotometriával vagy ionszelektív elektródok használatával.

Kórházi osztályokon is találunk elektródokat, melyek PoCT (point of care testing, azaz betegség melletti laboratóriumi diagnosztika) műszerek részei (Severinghaus & Astrup, 1985). A beteg véreből gyors pH, parciális oxigén és szén-dioxid szintek meghatározását teszik elérhetővé a hatékonyabb ellátás érdekében.

Vércukormérők között széles körben elterjedtek a bioszenzoros (elektrokémiai), illetve a fotometriás elven alapuló készülékek. A bioszenzoros mérő a reakció során létrejött elektromos változást jelzi, míg a fotometriás készülék esetében a reakciót színváltozás kíséri, melyet a készülék fotometriásan mér. A bioszenzoros mérők olyan elektródot tartalmaznak, melynek a felületére glükóz-oxidáz enzimet kötöttek. Oxigén és glükóz jelenlétében az enzimreakció során hidrogén-peroxid képződik, melyet a műszer mér, és meghatározza belőle a vérminta glükóz-koncentrációját. Ezen eszközök széleskörű elterjedése a bioszenzor-fejlesztés több, mint 100 éves múltja visszatekintő történetének a sikere.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Ebben a fejezetben a 'bioszenzor' definiálása után kitérek a glükóz szenzorok működésére. Bemutatom azokat a kihívásokat is, melyek az előkészítő munka megoldandó problémái voltak.

BIOSZENZOR DEFINÍCIÓJA

Bhalla és kollégái megfogalmazásában a bioszenzor „egy olyan eszköz, mely biológiai vagy kémiai reakciókat mér egy, a reakcióban résztvevő anyag koncentrációjának megfelelő nagyságú jel generálásával” (Bhalla et al., 2016). A bioszenzorok öt kötelező elemét sorolják fel, melyeket az alábbi táblázatban foglaltam össze az általunk használt glükóz-szenzor példáján.

1. táblázat: egy bioszenzor részei

analit	mérendő anyag	glükóz
bioreceptor	specifikus felismerést tesz lehetővé	glükóz-oxidáz
transzducer	a reakciónak megfelelő nagyságú jel létrehozása	platina elektród
elektronika	jelerősítés és analóg-digitális jelátalakítás	potenciosztát – Eco Chemie Autolab PGSTAT12
kimenő jel (output)	megjelenítésre alkalmas hardver és szoftver	számítógép, WindowsXP,

A használt enzimtől függően számos más anyagot is mérhetünk a fenti összeállításban, például koleszterint koleszterin-oxidázzal, laktátot laktát-dehidrogenázzal vagy -oxidázzal, fenolt tirozinázzal vagy glutamátot glutamát-oxidáz segítségével. Mindegyik esetben az enzimreakcióban olyan elektroaktív anyag keletkezik, amelyet tudunk mérni (O_2 , NADH, H_2O_2 , kinon).

A MÚLT KEZDETE: 1906.

Max Cremer a *Zeitschrift für Biologie* című folyóiratban publikálta megfigyelését, miszerint az oldat savkoncentrációjától függ az elektromos potenciál, mely mérhető (Cremer, 1906). Felfedezése 3 évvel előzte meg a pH – hidrogénion koncentráció – fogalmának bevezetését, mely Søren Peder Lauritz Sørensen nevéhez fűződik. Ezen elvek mentén 1922-ben Hughes készítette az első pH mérésére alkalmas üvegelektrodát (Hughes, 1922).

Leland C. Clark-ot a bioszenzorok atyjának nevezik, 1956-ban oxigén-elektrodát fejlesztett ki, majd 1962-ben azt az amperometriás bioszenzort, amely már glükóz mérésére volt alkalmas (CLARK & LYONS, 1962). Az oxigén-elektrodá azóta Clark-elektrodaként is ismert. Az első potenciometriás urea bioszenzort Guilbault és Montalvo fejlesztette 1969-ben (Guilbault & Montalvo, 1969), majd 1972-ben piacra került az első, otthoni használatra szánt glükózszenzor a Yellow Spring Instruments jóvoltából. A 80-as években megjelentek a napjainkig használt kis méretű műszerek első típusai is.

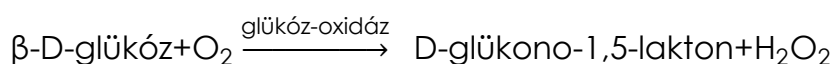
GLÜKÓZ-SZENZOROK

A 60-as évekbeli első leírás és az első kereskedelmi forgalomban kapható eszköz megjelenése között nagyjából 20 év telt csak el. A bioszenzorok első három generációja enzim alapú szenzor. Csoportosításuk az elektrontranszfer módja alapján történik. Napjainkban már negyedik generációs, enzimmentes glükóz szenzorról is említést tesznek (Naikoo et al., 2022).

Milyen út vezetett idáig és hogyan működnek ezek a szenzorok?

A szenzorok működésével számos tanulmány foglalkozik, ezek közül kettőt szeretnék kiemelni, melyek alapjait képezik a kísérletes munkámnak (Bhalla et al., 2016; Monteiro & Almeida, 2019).

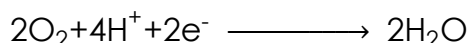
Példaként említettem (1. táblázat) egy glükóz szenzort. Esetében az alábbi enzimreakció játszódik le:



1. egyenlet

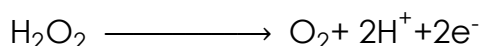
Mind az oxigén, mind a hidrogén-peroxid elektroaktív anyag, tehát elektrokémiai módszerekkel detektálhatóak.

Amennyiben a reakcióból egy szabadon diffundáló szubsztrátot vagy terméket mérünk, **első generációs bioszenzor**ról beszélünk. A legelső glükóz-szenzorok oxigén-elektródok voltak, melyekre enzimréteget kötöttek (immobilizáltak). Az oldatban oldott oxigén egy részét az enzimreakció felhasználja, az oldott oxidén koncentrációja így lecsökken. Az oxigénelektród felületén a következő reakció játszódik le:

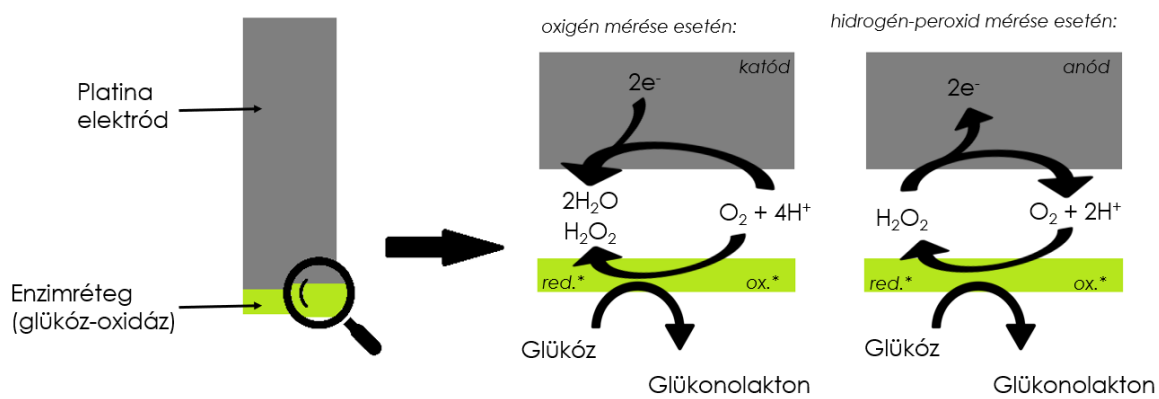


2. egyenlet

Az oxigén vízben rosszul oldódik, így előfordulhat, hogy az oldott oxigén csak a mintában jelenlévő glükóz egy részének oxidációjához elég, így pontatlan lesz a mérés. Jobb megoldás, ha a hidrogén-peroxidot detektáljuk. A két mérés közti különbség, hogy amíg az oxigént a katódon tudjuk mérni, a hidrogén-peroxidot az anódon. Az enzimreakció (1) után az elektród felületén lejátszódó reakció:



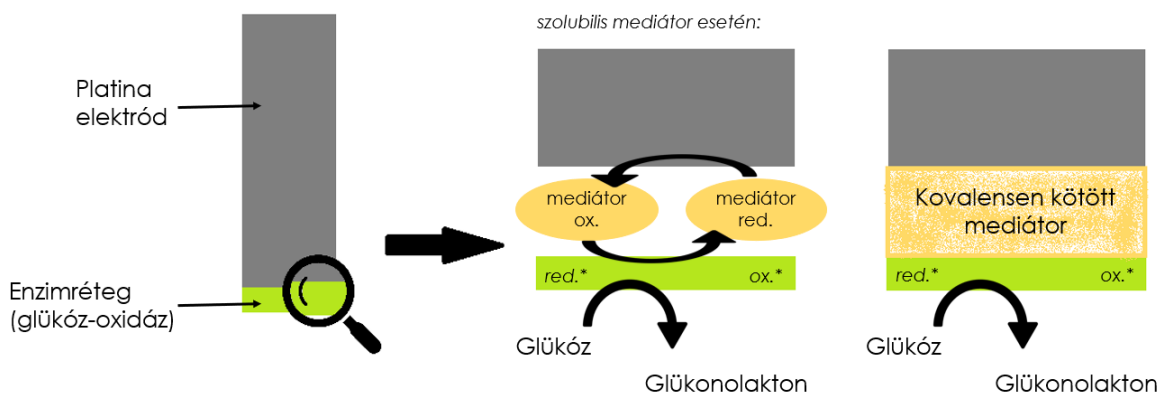
3. egyenlet



* az enzim is redukálódik és oxidálódik a reakciók során

1. ábra: Első generációs glükóz-szenzorok működése

A legelső otthoni használatra szánt vércukormérőkben már **második generációs szenzor** volt. Esetükben az elektronokat egy külön hozzáadott töltéshordozó, egy mediátor szállítja. Ez lehet oldható, vagy kapcsolódhat kovalens kötésekkel az immobilizációs mátrixba. Ilyen mediátor lehet például ferrocén, benzokinon vagy metilénkék. Oldható mediátor esetén adhatjuk közvetlenül a mintához vagy immobilizálhatjuk az enzimrétegbe is. A kovalens kötéssel kapcsolódó mediátorokat elektroenzimeknek is nevezik kettős funkciójuk miatt.

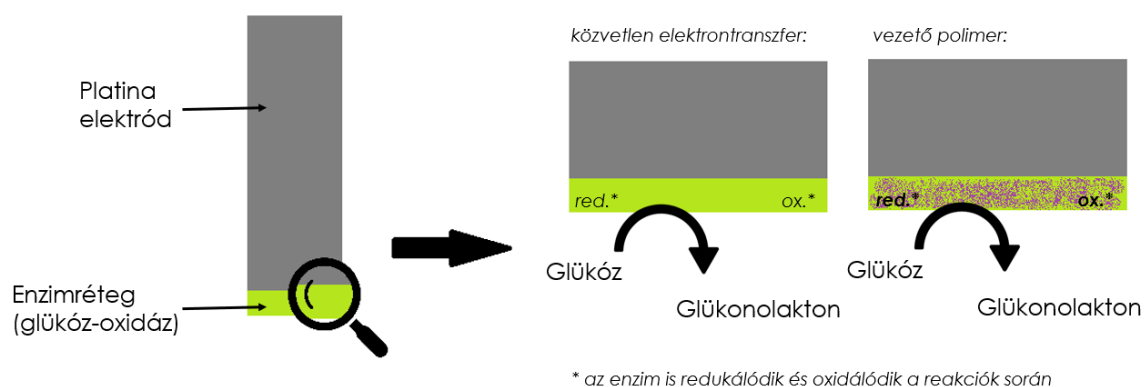


* az enzim is redukálódik és oxidálódik a reakciók során

2. ábra: Második generációs glükóz-szenzorok működése

A szenzorfejlesztés egyre gyorsuló ütemet mutatott, a 90-es évekre megérkeztek a **harmadik generációs szenzorok**, melyeknél mediátor nélküli elektrontranszfer történik. Az enzim átadhatja az elektronokat a munkaelektrodra közvetlenül vagy egy vezető mátrixon keresztül.

A klasszikusnak számító, főként ujjbegy kapilláris vérére igénylő mérők helyett a fejlesztések jelenleg a noninvazív technikákra összpontosítanak. Már a 2000-es években piacra kerültek az első olyan szenzorok (harmadik generációs elektróddal), melyek a bőr felszínén, verejtékből mérve adnak egy értéket az aktuális vércukorszintre.



3. ábra: Harmadik generációs glükóz-szenzorok működése

AZ OPTIMÁLIS ELEKTRÓDMÉRET

Egy patkány agy az anteroposterior tengelyben körülbelül 2-2,5 cm hosszúságú, szélessége és magassága egyaránt 1 cm körüli. Az egyes agyterületek, magcsoportok 1 mm³ térfogaton helyezkednek el. A PFC az agy frontális lebenyét borító szürkeállomány, így gyakorlatilag az agy elején egy maximum 1 mm vastag „sapkaként” képzelhető el. Ennek tudunk mérni a „tetején” – dorzálisan vagy az „alján” – ventrálisan is. A nagyobb, több mm külső átmérőjű elektródok azonban ilyen dimenziókban szóba sem jönnek. Olyan elektródra van szükség, melynek a külső átmérője maximum 1-1,5 mm. Nagyobb elektróddal csak elroncsolnánk az agyszövetet.

MÉRÉST ZAVARÓ TÉNYEZŐK KIKÜSZÖBÖLÉSE

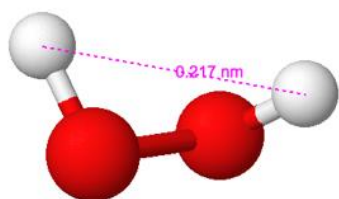
A **hidrogén-peroxid** minden sejtben jelen van, sejtlélegzés során a mitokondriumok, mikroszómák és peroxiszómák termelik (Chance et al., 1979; Patole et al., 1986). Fiziológiásan másodlagos messenger molekulaként a dopaminerg jelátvitelben modulátor szereppel bír. Parkinson-kórban hozzájárul az oxidatív stresszhez, így az idegsejtek elpusztításához. A képződő mutáns alfa-szinuklein permeabilizálja a dopamint tároló vezikulák membránját, így a dopamin a citoplazmába kerül, ahol hidrogén-peroxid és szuperoxidok dopamin-kinonná oxidálják, melyről ismert, hogy toxikus az idegsejtekre (Nandi et al., 2019).

A C-vitamin, másnéven **aszorbinsav** minden víztérben jelen van, az emberi agyban szintje 2-10 mM közötti (Lykkesfeldt & Tveden-Nyborg, 2019), patkány agyban ennél kevesebbet mértek (Adlard et al., 1973; Hornig, 1975). Méretét tekintve a hidrogén-peroxidnál lényegesen nagyobb molekula.

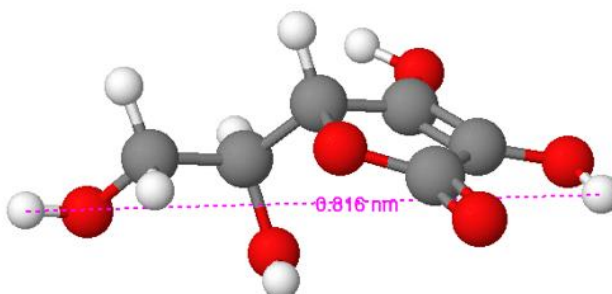
Az elektródok készítésénél két tényezőt kell figyelembe venni. A nagy molekulaméretű aszorbinsav detektálását meg kell akadályozni, illetve a mért áramerősség értékelésekor figyelembe kell venni, hogy a fiziológiásan jelen lévő hidrogén-peroxidra is válaszol az elektród.

Méretkizárásos réteget számos polimerből készítettek már, többek között a feniléndiamin polimereit széles körben használják (Murphy, 1998; Wilson et al., 2018). A PTE TTK Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén is használtak korábban meta-feniléndiamint (mPDA) (Nagy et al., 2002). Elektropolimerizációval egy ultravékony réteggel módosították az elektród felületét. 10 mM-os mPDA oldatában amperometriával 5

másodperc alatt felépül egy olyan réteg, mely képes megakadályozni az aszkorbinsav detektálását.



Hidrogén-peroxid



Aszkorbinsav

4. ábra: 3D molekula-modellek; <https://molview.org>

A fiziológiásan jelen lévő hidrogén-peroxid és más kis méretű elektroaktív anyagok jelenlétének detektálásához szükség van egy enzimréteget nem tartalmazó elektródra is. Így minden méréshez két elektródot kell készíteni. Aszkorbinsav detektálásának kivédésére poli-mPDA réteggel kell ellátni őket, azonban enzimréteget csak az egyikre kell immobilizálni.

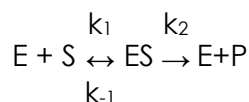
A VÁRHATÓ GLÜKÓZ-KONCENTRÁCIÓ

Az intersticiális tér összetételének vizsgálatára az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a mikrodialízis (Chefer et al., 2009). Chefer és munkatársai kiemelik, hogy a mikrodialízis technikának - számos előnye mellett - vannak hátrányai is, főleg az elektrokémiai módszerekkel szemben. Ugyan a szelektivitás és pontosság biztosított, a gyűjtött dializátum bármilyen technikával analizálható, de nem ad valós idejű információt és a mintagyűjtés ideje is hosszabb, mint egy elektrokémiai mérés során. A mikrodialízissel mért koncentrációk azonban jó kiindulási alapot adnak a saját mérésekhez, ezek alapján meg tudunk adni egy várható koncentrációtartományt, melyben az elkészített elektródoknak működniük kell. Fellows és munkatársai által végzett glükóz-szinteket vizsgáló tanulmányban olvasható, hogy patkányokban (kontroll állatoknál) agyi extracelluláris térben 0.5 mmol/l alatti koncentrációt sikerült detektálniuk (Fellows et al., 1992).

Fontos tényező, hogy az elektródra véges mennyiségű enzimet lehet immobilizálni. Ezért érdemes úgy kialakítani a protokollt, hogy az elektródra kerülő enzim képes legyen a kívánt koncentráció-tartományban mérni. Első lépésként a Michaelis-Menten kinetikához érdemes visszanyúlni.

Enzimkinetika

Az enzimek a reakciókat katalizálják, elérhetővé tesznek egy alacsonyabb energiájú reakciót. Az enzimből (E) és szubsztrátból (S) egy komplex (ES) képződik, majd ez a komplex bomlik az enzimre (E) és a termékre (P).



4. egyenlet

A k_1 , k_{-1} , k_2 reakcióállandók, melyekből a Michaelis-Menten állandó (K_m) meghatározható. Az enzim-szubsztrát komplex kialakulása reverzibilis folyamat, a k_1 a komplex képződésének reakcióállandója, míg a k_{-1} , a bomlásáé.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

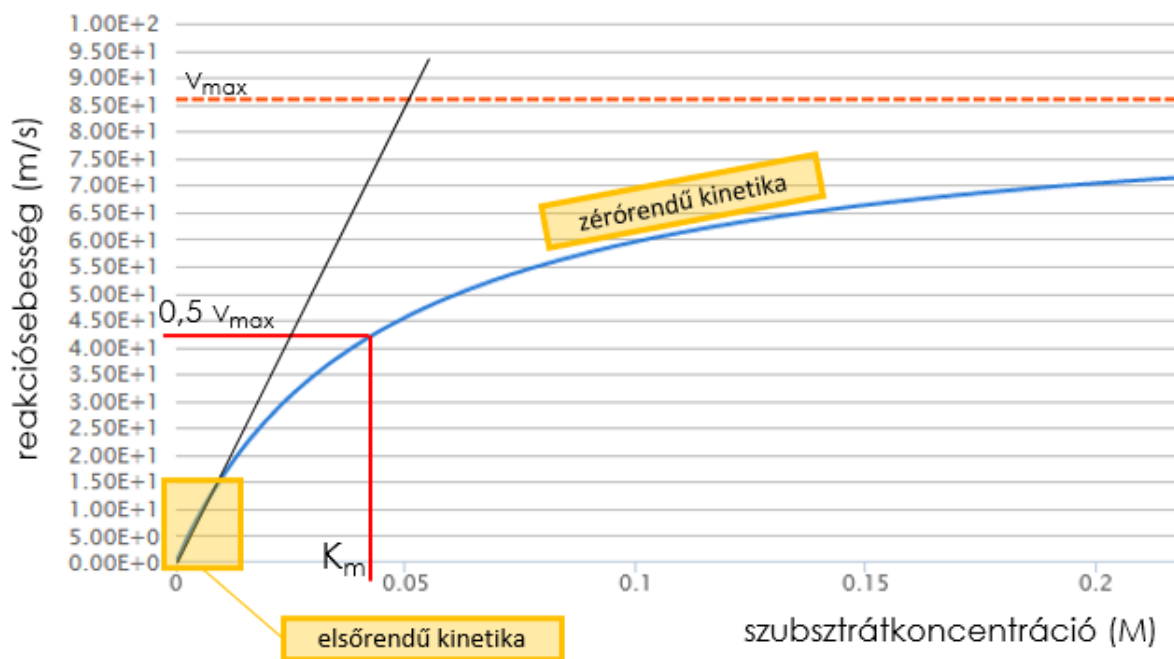
5. egyenlet

A szubsztrátkoncentráció ($[S]_0$) és reakciósebesség (v_0) összefüggését a Michaelis-Menten egyenlet írja le. Az összefüggés az enzimkinetika egyszerű leírására használt.

$$v_0 = \frac{v_{0,\max} \times [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

6. egyenlet

A $v_{0,\max}$ a kezdeti maximum reakciósebességet jelöli. A reakciósebesség és szubsztrátkoncentráció összefüggését grafikonon megjelenítve derékszögű hiperbolát kapunk.



5. ábra: Michaelis-Menten kinetika; <https://apps.media.unc.edu/biochem500/charts/>

A görbe kezdeti szakasza lineáris, így alacsony szubsztrátkoncentráció esetén elsőrendű enzimkinetikáról beszélünk.

$$v_0 = \frac{v_{0,\max} \times [S]_0}{K_m}$$

7. egyenlet

A görbe további szakaszán a kinetika zérórendűvé válik, az enzim szubsztrátkötő helyei telítődnek, a görbe ellaposodik. Ekkor $v_0 = v_{0,\max}$. A reakciósebesség megadható a katalitikus állandó ($k_2 = k_{\text{kat}}$) és az enzimkoncentráció szorzataként.

$$v_{0, \max} = k_{\text{kat}} \times [E]_0$$

8. egyenlet

Enzimelektrodoknál általánosságban a lehető leggyorsabb reakciósebességet és nagyfokú szelektivitást szeretnénk elérni, tehát minél nagyobb a $v_{0, \max}$, és minél kisebb a K_m , annál közelebb vagyunk a kívánt célhoz. A kalibráció szempontjából a görbe lineáris, elsőrendű kinetikájú szakasza fontos. Erre a szakaszra eső koncentrációtartomány limitálja az elektród felhasználhatóságát. Az általam készített elektródot akkor tudom az állatkísérletekhez felhasználni, amennyiben a kalibrációs görbe lineáris szakasza lefedi a 0-10 mM glükóz-koncentrációkat.

Enzim-immobilizációs technikák

Az irodalomban számos technikát leírtak, de alapvetően az enzim-immobilizációs technikák három nagyobb csoportját különítik el (Monteiro & Almeida, 2019; Sassolas et al., 2012). Egyrészt immobilizálhatjuk az enzimet adszorpcióval, másrészt beágyazhatjuk egy membránba, polimerbe, harmadrészt direkt kémiai kötésekkel is megköthetjük.

A PTE TTK Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén korábban albumin-gélrétegbe ágyazott enzimmel készítették bioszenzorokat, a gél stabilitását glutáraldehid keresztkötésekkel biztosítva (Nagy et al., 2002).

Enzim immobilizálásra egy másik, korábban már használt módszer is felmerült (Guilbault & Montalvo, 1969). Itt egy poliakrilamid réteg tartalmazza az enzimet. Különlegessége, hogy riboflavint tartalmaz és a réteg polimerizációja UV fényre történik.

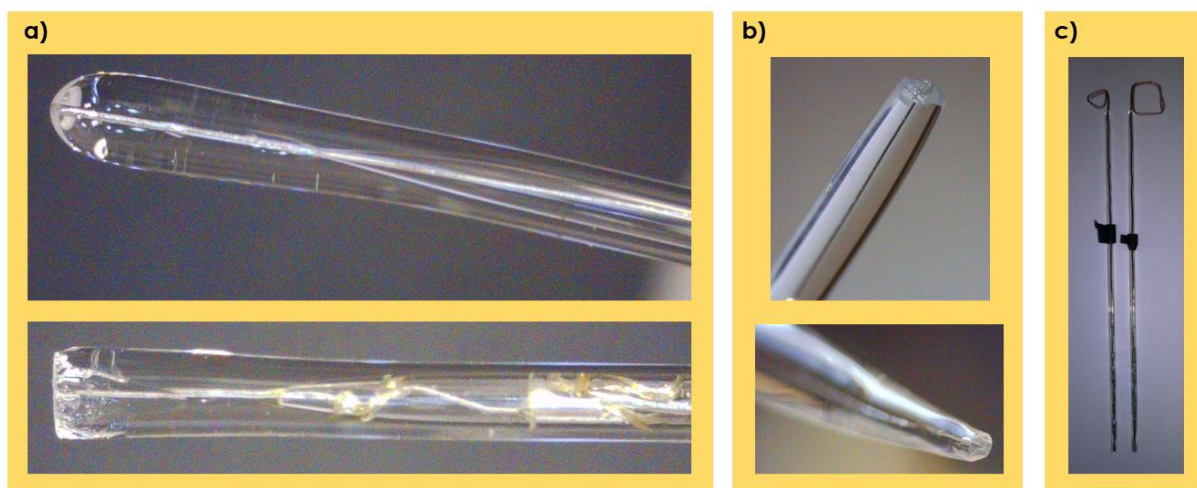
MÓDSZEREK

Elektródméret, szelektivitás, enzimréteg – előzőleg ezt a három kihívást említettem. Ebben a fejezetben a módszereken túl bemutatom a három probléma megoldását is.

ELEKTRODKÉSZÍTÉS

Az elektródkészítés során egy és másfél milliméter külső átmérőjű üvegapilláris állt rendelkezésemre. Ezek belső átmérője pontosan fél és háromnegyed milliméter. A nagyobb kapillárisba fél milliméter átmérőjű platinaszál került, a platina és a kivezetett drót közti érintkezés biztosítására forrasztóönt alkalmaztam.

A kisebb kapillárisba a fél milliméteres platina nem fért bele, ezért vékonyabbat kellett használnom. Itt 25 és 100 μm -es platinaszálakat alkalmaztam, így ezek az elektródok már mikroelektródnak számítanak.



6. ábra: Elektródok

- a) 100 μm -es platinaszál tartalmazó elektród. A felső képen még csak az üveget olvasztottam meg a platina köré, az alsón pedig a kész, lecsiszolt elektród látszik, jobb oldalon a csillogó ónnal. A kapilláris külső átmérője 1 mm.
- b) 25 μm -es platinaszál tartalmazó elektródok. A kapilláris külső átmérője 1 mm.
- c) 1,5 mm külső átmérőjű kapillárisok, bennük 0,5 mm átmérőjű platínával.

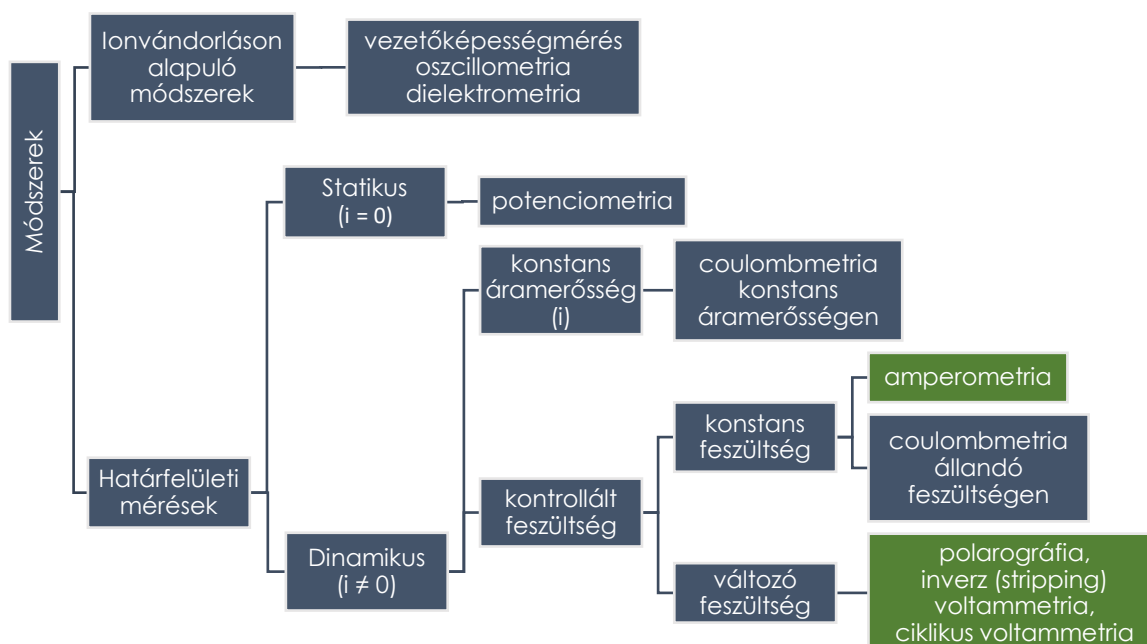
Az elkészült elektródokat P4000-es csiszolóbarsonyon, nedves polírozással tisztítottam. Elektrokémiai tisztítást is végeztem ciklikus voltammetria (CV) módszerével 0,5 mol/dm³ kénsvoldatban 0,2-0,8 V között 2 ciklusban.

A két tisztítási lépést minden esetben közvetlenül az enzimréteg készítése előtt végeztem.

MÉRÉSI LEHETŐSÉGEK

Az elektroanalitikai módszereket két nagy csoportra oszthatjuk; ionvándorláson alapuló módszerek (például vezetőképességmérés) és határfelületi módszerek. A határfelületi módszerek lehetnek statikusak ($i=0$, például potenciometria) vagy dinamikusak ($i\neq 0$). Alapszabály, hogy az áramerősséget és feszültséget nem lehet

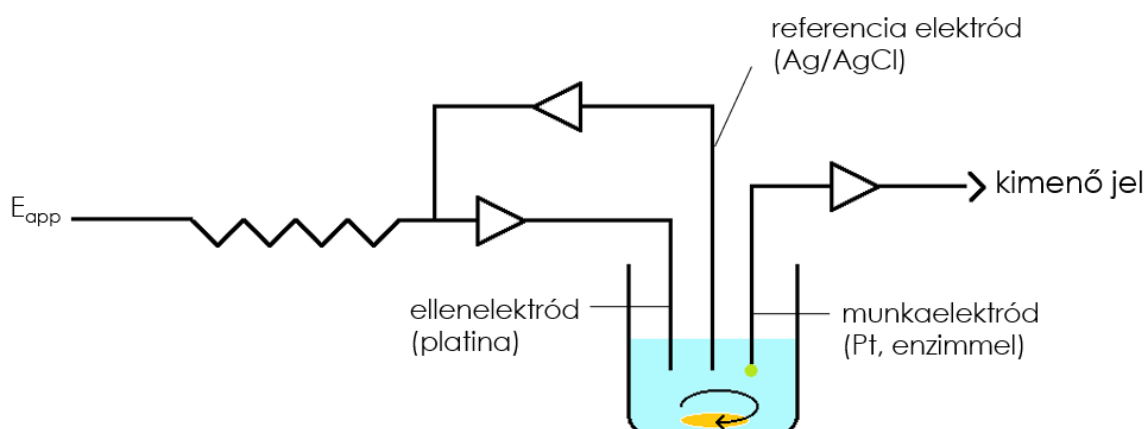
egyszerre kontroll alatt tartani. Coulombmetriás titrálásnál az áramerősség konstans, míg voltammetriánál és amperometriánál a feszültséget kontrolláljuk. A kísérletek során a felsorolt módszerek közül amperometriát és voltammetriát használtam.



7. ábra: Elektrokémiai módszerek csoportosítása a használt technikák kiemelésével

A kalibrációs méréseket három elektródból álló elektrokémiai cellában végeztem. Az enzimet tartalmazó platina munkaelektrodon kívül egy szintén platina ellenelektrodot és egy ezüst/ezüst-klorid referenciaelektrodot használtam.

Állatban történő méréseknél - helyhiány és az agy további roncsolásának elkerülésére - egy 250 μm -es ezüstszára volt a referencia és az ellenelektrodok elvezetése sorosan csatlakoztatva.



8. ábra: Elektrokémiai cella felépítése; E_{app} jelöli a beállított feszültséget, az oldat keverhető

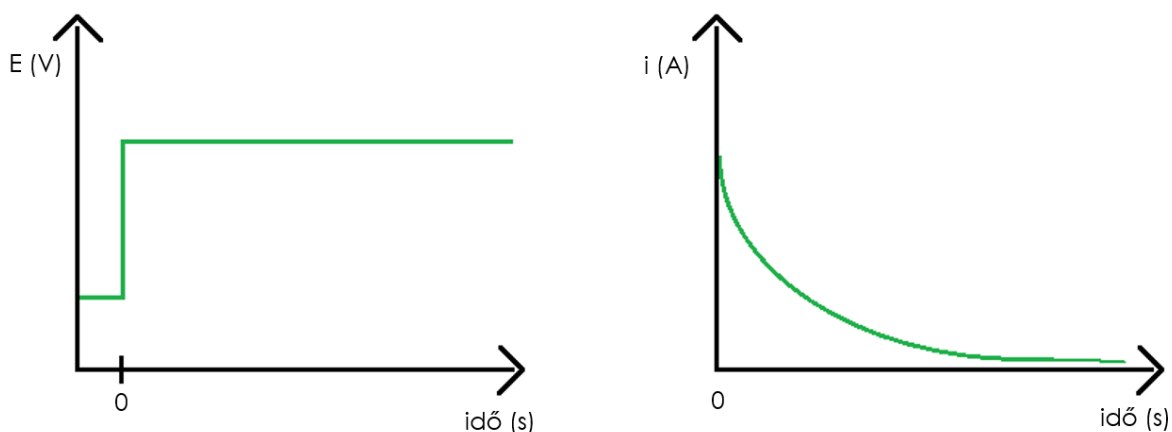
Amperometria esetén áramerősséget regisztrálunk idő függvényében, a potenciált egy konstans értéken tartva. A mért áramerősség lecsökken, ahogy az elektród körüli

úgynevezett diffúziós réteg kimerül. Az áramerősség függését a diffúziótól a Cottrell-egyenlet írja le.

$$i = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t}}$$

9. egyenlet

Az egyenletben n az elektronok számát, F a Faraday állandót (96500 C/mol), A az elektródfelület (cm²), C a koncentrációt, D a diffúziós koefficiens, t a másodpercekben mért időt jelöli. Keverés nélkül az elektródfelület közvetlen közelében lecsökken a mérendő anyag koncentrációja, ezáltal lecsökken a mért áramerősség.



9. ábra: Kronoamperometria (CA)

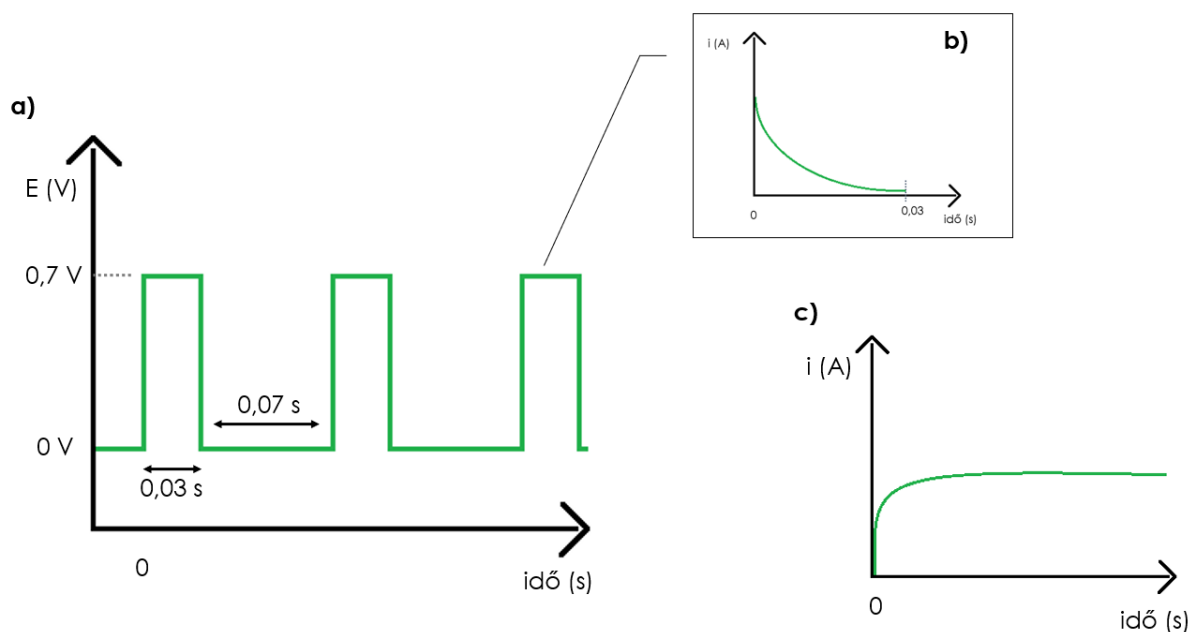
Az első ábrán látható a mérés nulla pontjától kezdve konstans értéken tartott potenciál, a második ábrán pedig egy típusos CA görbe, ahol az áramerősség fokozatosan lecsökken.

A diffúziós réteg kimerítése a kronoamperometria (CA) hátránya. Az oldat keverése részben megoldást kínál; a diffúziós réteg vastagsága lecsökkenthető. A módosított összefüggésben a δ ezt a vékonyabb réteget jelöli.

$$i = \frac{nFADC}{\delta}$$

10. egyenlet

Másik lehetőség, hogy nem akarjuk lecsökkenteni a diffúziós réteg vastagságát, hanem hagyunk időt az újratöltődésére. Ezt **periodikusan megszakított amperometria (PIA)** módszerével tehetjük meg, melyet a PTE TTK Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén már használtak korábban (Nagy et al., 2006). A potenciált itt is 0,7 V-ra állítjuk be, azonban ezt ciklusokban alkalmazzuk (**10. ábra**). Minden 0,7 V-os ciklust egy 0 V-os követ, amely ideje alatt a diffúziós réteg újratöltődik. A tényleges mérés a 0,7 V-os ciklusokban történik. Ekkor a beállított idő (30 ms) alatt tulajdonképpen egy klasszikus CA-nak megfelelő görbét veszünk fel (b), melynek átlaga fog egy pontként a végleges mérési görbén (c) megjelenni.



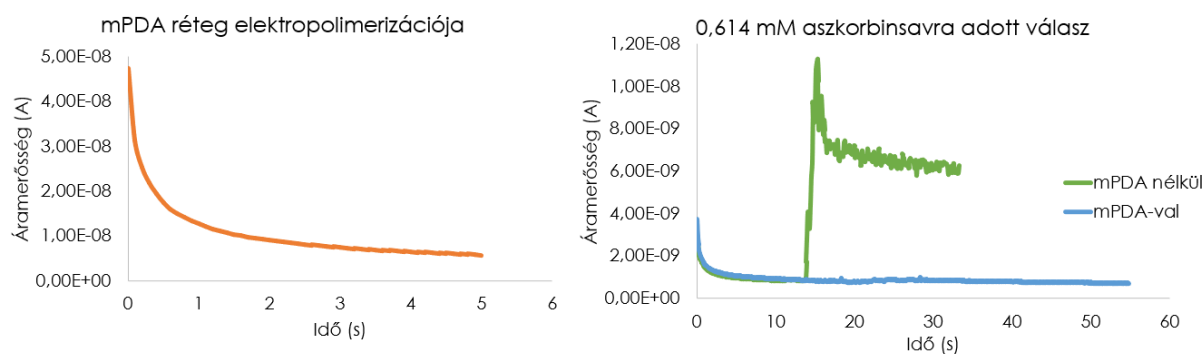
10. ábra: Periodikusan megszakított amperometria (PIA)

- a) potenciál és idő viszonya PIA esetén
- b) a mérés a 0,7 V-ra beállított ciklus alatt történik, ekkor 0,03 s alatt felvesszünk egy kronoamperometriás görbét
- c) a végleges görbe, melyen a számos mért kronoamperometriás ciklus görbéjének átlagai jelennek meg, az áramerősség nem csökken le, mert a mérési ciklusok közötti szünet biztosítja a diffúziós réteg újratöltődését

A potenciosztáthoz (Eco Chemie Autolab PGSTAT12) tartozó számítógépes program a mért értékek kezelésekor a **0,00E±00** tudományos számformátumot használja, így a bemutatott görbéimen ezek jelennek meg és a különböző számítások elvégzéséhez sem változtattam rajta.

SZELEKTIVITÁS BIZTOSÍTÁSA

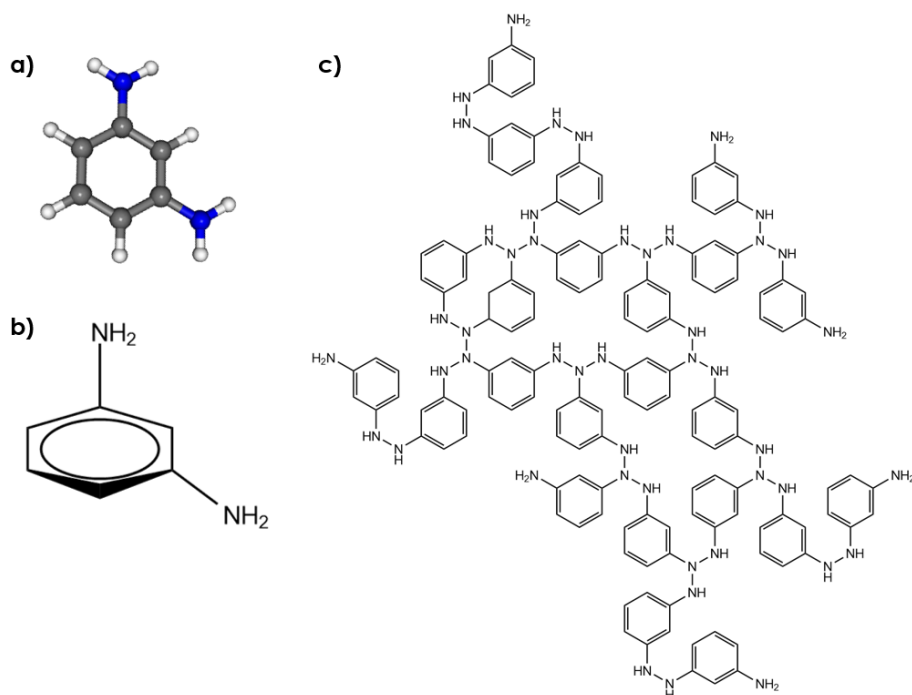
A hidrogén-peroxid és az aszkorbinsav méretkülönbségét kihasználva méretkizárásos réteget alkalmaztam. Meta-fenilén-diamin 10 mM-os oldatában 0,7 V-on, 5 másodperces amperometriás mérés alatt hoztam létre a réteget, melyet utána aszkorbinsav oldattal tetsteltem.



11. ábra: poli-mPDA ultravékony réteg készítése és tesztelése 25 μ m-es platinát tartalmazó elektródnál

Az irodalmi adatok alapján 0,5 mmol/L koncentrációt választottam a réteg tesztelésére (Gonon et al., 1981; Grünewald, 1993). Az oldatkészítés megkönnyítése céljából a célkoncentráció feletti 0,6 mmol/L koncentrációt eredményező hozzáadást alkalmaztam. Látható, hogy a polimer réteg nélküli elektród adott választ az aszkorbinsav-oldat hozzáadására, míg az ultravékony réteggel ellátott elektród nem válaszolt.

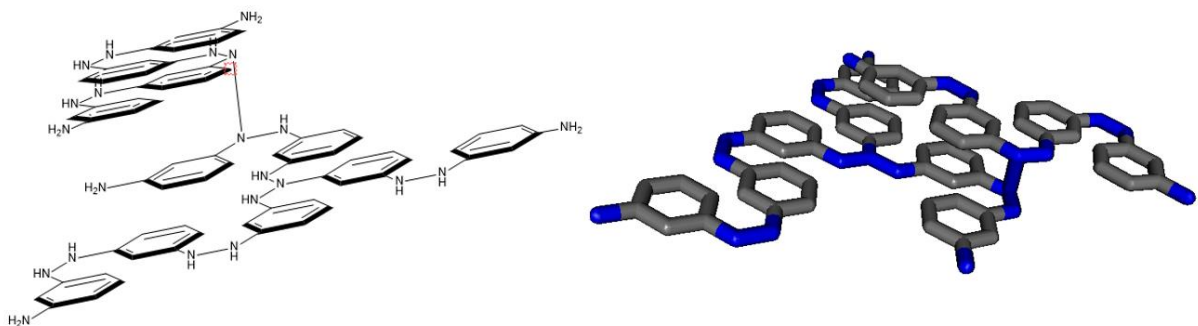
A PTE TTK Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén korábban Angyal Tünde foglalkozott az így létrehozott polimerréteg szerkezetével. Megállapította, hogy a polimer réteges, az aromás gyűrűk síkjában felépül egy térháló, azonban egy-egy nitrogén létrehoz kötéseket a síkra merőlegesen is, így több réteg is fel tud épülni. Ennek modellezésére ChemDraw és Molekel programokkal készítettem az alábbi ábrákat (a sík térháló modelljét Nagy Livia Tanárnő egy korábbi ábrája nyomán).



12. ábra: mPDA monomer szerkezete és polimer-térháló egy síkban

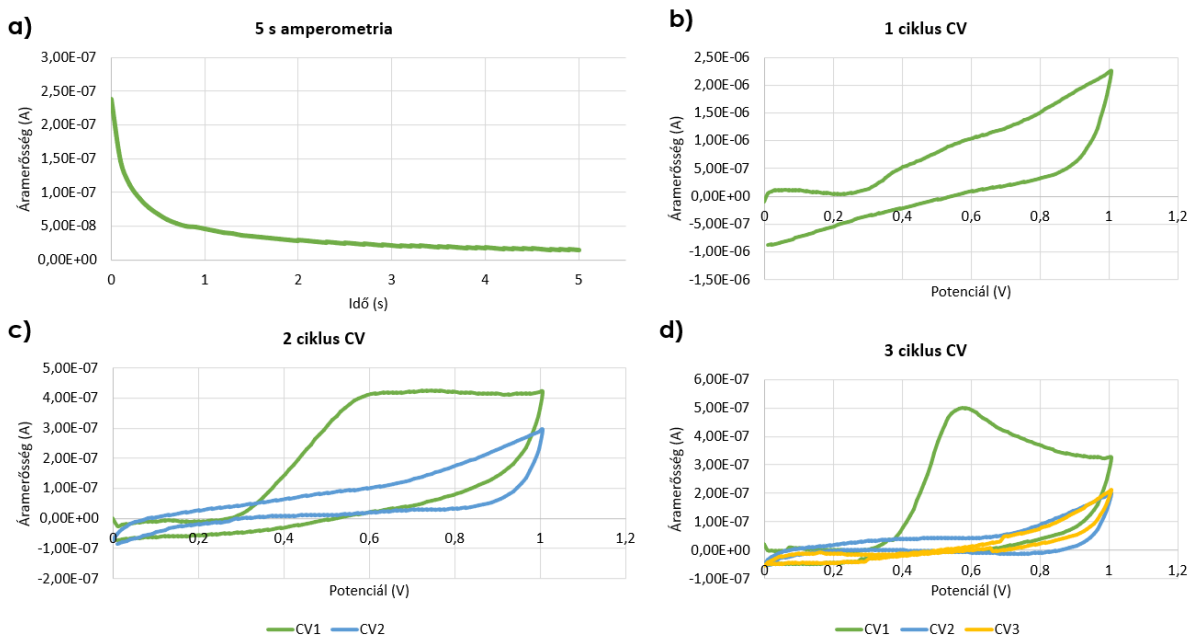
- a) meta-fenilén-diamin 3D modellje
- b) az amino-csoportok nem csak az aromás gyűrű síkjában helyezkedhetnek el
- c) polimer térháló ($n = 23$), melyen láthatóak azok a „hézagok”, melyeken a hidrogén-peroxid még átfér, de az aszkorbinsav átjutása már akadályozott.

A polimer rétegességének bemutatására a fent említett programokkal készítettem egy polimer-részletet, mely mutatja a két réteg összekapcsolódását.



13. ábra: poli-mpDA rétegessége

A ciklikus voltammetria (CV) elterjedt módszer a méretkizárásos réteg létrehozására, ezért az ezzel a módszerrel, és amperometria módszerével létrehozott rétegeket összehasonlítottam. 100 μm -es platinaelektrodokat használtam, melyeket a már ismertetett protokoll szerint tisztítottam. Először méretkizárásos réteg nélkül teszteltem az elektrodok válaszát 0,6 mM aszkorbinsavra, majd egy újabb tisztítást követően létrehoztam 4 különböző módon a poli-mpDA réteget. Az elektrodokat újból teszteltem aszkorbinsav-hozzáadással. Hibahatárnak 5 nA áramerősség-emelkedést tekintettem, ez alatt az elektrod alkalmas patkányagyban történő mérésre. A méréseket CA és PIA módszereivel is elvégeztem.



14. ábra: 4 mód a méretkizárásos réteg létrehozására

- a) 5 s amperometria, ultravékony réteg készítése
- b-d) ciklikus voltammetria 0 – 1 V között, 0,5 V/s scan rate, 1-3 ciklusok alkalmazásával

2. táblázat: Méterkizárásos rétegek összehasonlítása

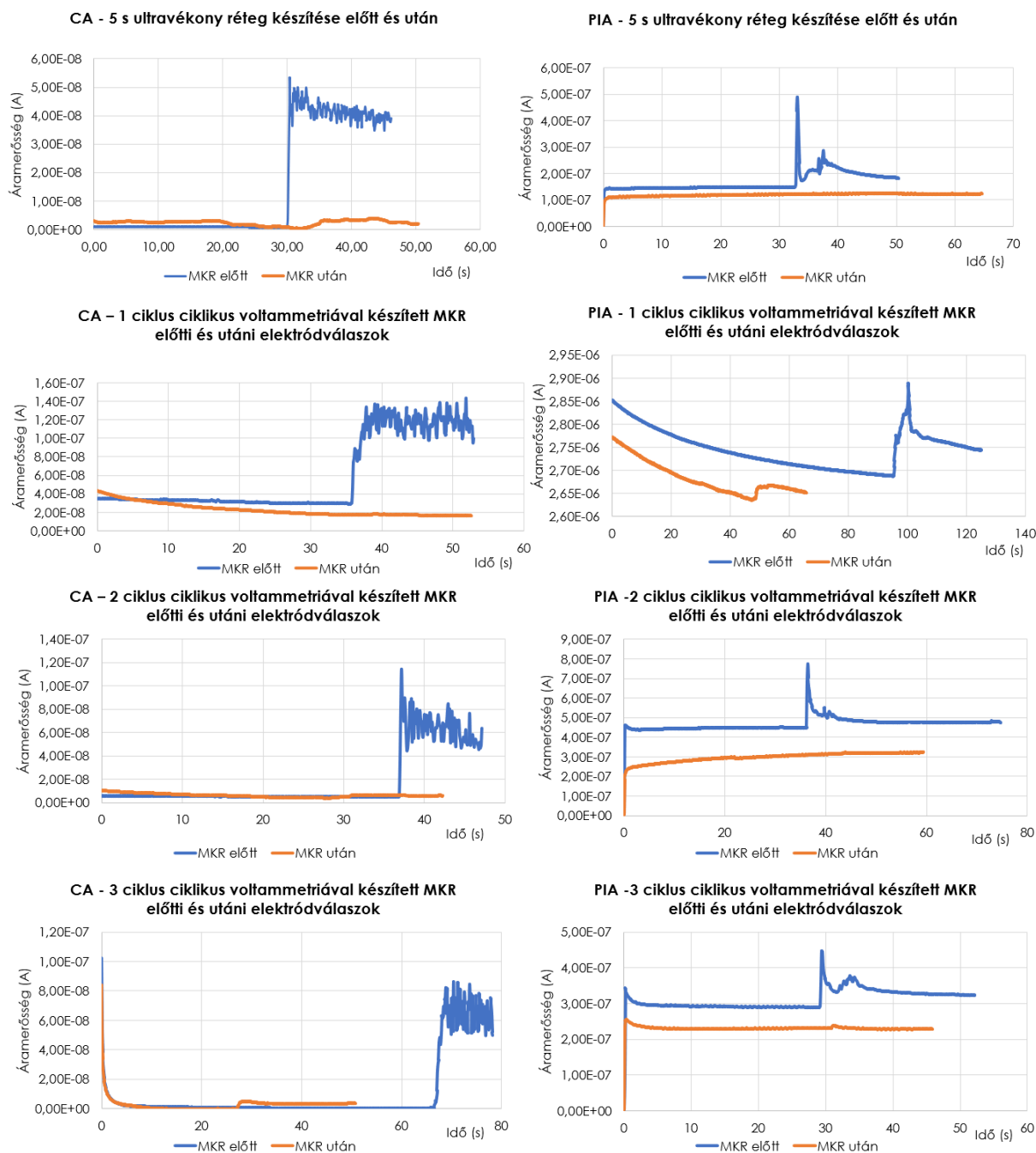
RÉTEGKÉSZÍTÉS		5 s amperometria		1 CV		2 CV		3 CV	
ELEKTRODVÁLASZOK		átlag (A)	SEM/SEMD	átlag (A)	SEM/SEMD	átlag (A)	SEM/SEMD	átlag (A)	SEM/SEMD
CA	HA előtt	9,19969E-10	6,3651E-12	3,06965E-08	4,91125E-11	5,74E-09	4,02832E-10	2,76463E-10	9,02767E-12
	HA után	4,0337E-08	4,0337E-08	1,18364E-07	9,54786E-10	6,4314E-08	1,122E-09	6,51708E-08	9,91186E-10
	KÜL	3,94171E-08	3,84707E-09	8,76676E-08	1,21673E-08	5,8574E-08	8,06811E-09	6,48944E-08	7,15348E-09
	HA előtt	1,31928E-09	5,12843E-11	1,76107E-08	8,6852E-11	4,563E-09	2,28611E-11	6,10352E-11	1,743E-11
	HA után	3,4619E-09	2,542E-11	1,81205E-08	3,95142E-11	6,4947E-09	2,3815E-11	3,52723E-09	1,17078E-11
	KÜL	2,14262E-09	3,81463E-10	5,09827E-10	5,02623E-09	1,9317E-09	8,98082E-10	3,46619E-09	3,91961E-10
PIA	HA előtt	1,48764E-07	2,446E-11	2,69283E-06	2,20049E-10	4,5062E-07	5,31286E-11	2,90556E-07	8,4782E-11
	HA után	1,89519E-07	4,49813E-10	2,76238E-06	4,26299E-10	4,8004E-07	2,89576E-10	3,32578E-07	4,45323E-10
	KÜL	4,07546E-08	2,91419E-08	6,955E-08	3,52156E-07	2,9416E-08	5,62562E-08	4,20218E-08	4,54951E-08
	HA előtt	1,20788E-07	9,62682E-11	2,64375E-06	5,41889E-10	3,1576E-07	2,23296E-10	2,31992E-07	8,31377E-11
	HA után	1,23472E-07	6,6383E-11	2,66529E-06	1,85084E-10	3,2063E-07	1,3009E-10	2,33518E-07	3,65249E-10
	KÜL	2,68396E-09	1,73673E-08	2,15428E-08	4,12395E-07	4,8712E-09	6,28049E-08	1,52673E-09	4,82022E-08

CA – kronoamperometria, PIA – periodikusan megszakított amperometria

MKR – méterkizárásos réteg, HA – 0,6 mM aszkorbinsav-oldatot eredményező hozzáadás, KÜL – az átlagok különbsége

SEM – az átlag szórása, standard error of the mean - SEM = $\sqrt{\frac{\text{szórás}}{\text{elemszám}}}$

SEMD – átlagok különbségének szórása, standard error of the mean difference - SEMD = $\sqrt{\frac{\text{átlag}^2}{\text{elemszám}_1} + \frac{\text{átlag}^2}{\text{elemszám}_2}}$



15. ábra: Aszkorbinsav-oldat hozzáadások görbéi, az elért koncentráció 0,6 mM

A PTE TTK Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszéken az eddig gyakorlat szerint az elektródok méretkizárásos rétegét CA-val ellenőrizték, ekkor használták az általam is említett 5 nA-es hibahatárt. Mivel mind a négy elektród hibahatáron belül volt, az állapotban történő mérésre alkalmasnak tűntek. A CA mérésekből látható, hogy a legnagyobb arányú áramerősség-csökkenést az egy és két ciklusú CV-vel létrehozott réteggel értem el. Egy ciklus esetén a méretkizárásos réteggel ellátott elektród 172-szer, két ciklus esetén 30-szor kisebb áramintenzitás-növekedést mutatott. Ezt azonban a PIA mérés nem támasztja alá. Három ciklus CV alkalmazása esetén már nincs nagyságrendbeli eltérés a két mérési módszer között. CA-val 18-szor, PIA-val 27-szer kevesebb aszkorbinsavat mért az elektród. 3 ciklus alatt azonban a felépülő réteg vastag, robusztus. Az öt másodperces amperometriával létrehozott ultravékony réteg

ezzel szemben kevésbé szigetel, és hasonló minőségben biztosítja az aszkorbinsav kizárását.

Az állatkísérletekben használt elektródok méretkizárásos rétegét ezért 5 másodperc alatt amperometriával készítettem.

ENZIMRÉTEG

Az enzimiréteg kialakításához elsőként albumin gélbe ágyazott enzimet próbáltam ki. Több verziót is teszteltem, de legjobbnak azok az elektródok minősültek, melyeknél már a gélbe is tettem egy kevés glutáraldehidet. Korábbi kísérletek során glutáraldehid gőzébe tették az elektródot 10-20 percre, azonban így tapasztalataim szerint a keletkező „enzimsapka” könnyebben leválik. Felmerült, hogy a géles réteg bármilyen formában túl sérülékeny lehet az állatban történő méréshez és a behelyezés-kihúzás során mechanikai sérülés érheti az elektródot, amely szintén a gél leválásához vezethet. Emiatt kipróbáltam akril-polimerbe ágyazni az enzimet. Mindkét megoldás sikerre vezetett, azonban a géles réteg készítése egyszerűbb és gyorsabb, illetve kevesebb enzimet kell felhasználni hozzá, így elsődlegesen az állatkísérletekhez ezt preferáltam, de amennyiben ez nem fog beválni, rendelkezésre áll a másik módszer is. A két enzimiréteg összetételét az alábbi táblázatba foglaltam össze.

3. táblázat: két mód az enzimiréteg készítéséhez

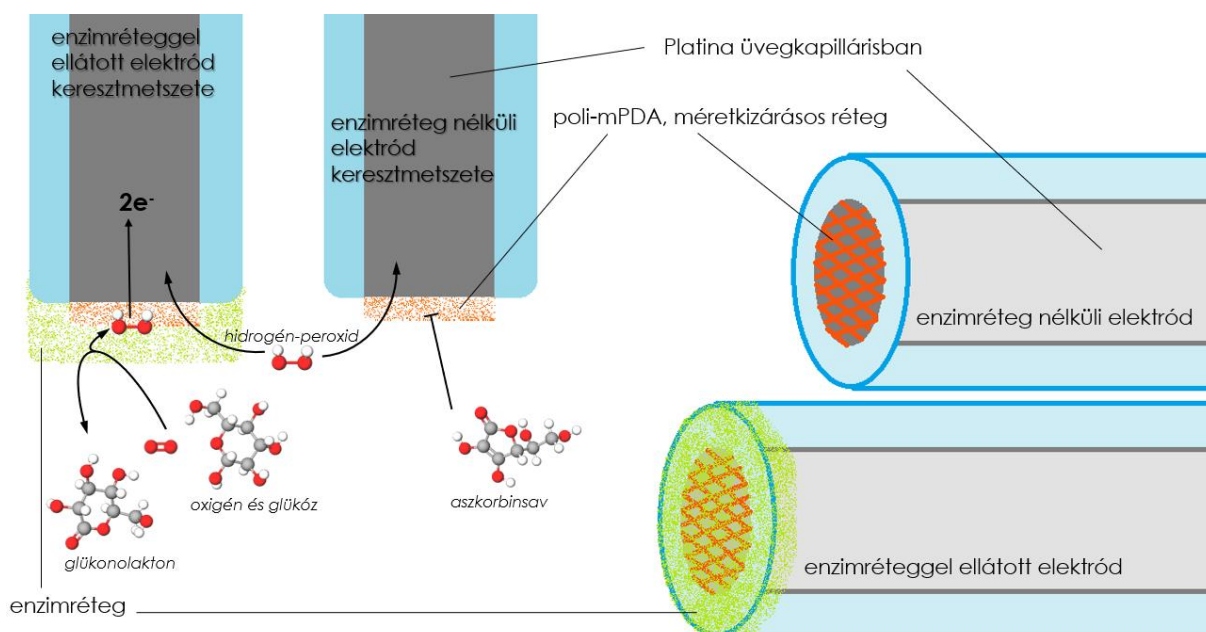
	GÉL	AKRIL
Összetétel	1,53 mg glükóz-oxidáz (Sigma, 147019 U/g) 2,45 mg BSA – bovine serum albumin (Sigma) 18 µl foszfát puffer (0,1 M, pH = 7,4) 2 µl 2,5%-os glutáraldehid oldat (25%-os oldatból hígítottam foszfát puffer felhasználásával)	<u>monomer oldat</u> (25 ml PBS-ben): 450 µl tetrametilén-etilén-diamin (TEMED) 5 g akrilamid 3 mg K₂S₂O₈ 3 mg riboflavin <u>glükóz oxidáz:</u> 20 mg/0,9 ml monomer oldat
Megjegyzések	A gél 10-15 perc alatt köt meg. ~1 µl-t viszek fel az elektród felszínére. Az elkészült elektród ~15 perc levegőn száradás után már használható. Első mérésnél a meg nem kötött részek leválnak.	1 µl-t pipettával vittem fel az elektród felületére, melyet utána 10 percig UV lámpa alatt polimerizáltam. Amint megkötött a polimer, az elektród használható.

MEGOLDÁSOK ÖSSZEFOGLALÁSA

4. táblázat: Megoldások

Probléma	Megoldás
elektród mérete	maximum 1,5 mm átmérőjű elektród, de a legideálisabb az 1 mm átmérőjű
fiziológiásan jelen lévő H_2O_2	az elektródokat párosával kell készíteni és használni, egyiket enzimiréteg nélkül, másikat enzimiréteggel
aszorbinsav	mPDA méretkizárásos réteg elektropolimerizációja minden elektródra
várható glükóz-koncentráció céltartománya	0-10 mM tartományt kell lefednie a kalibrációs görbe lineáris szakaszának

A készített elektródok sémás ábrája és működése az alábbi ábrán látható.



16. ábra: Elektródok sémás ábrája és működése

KALIBRÁCIÓS MÉRÉSEK EREDMÉNYEI

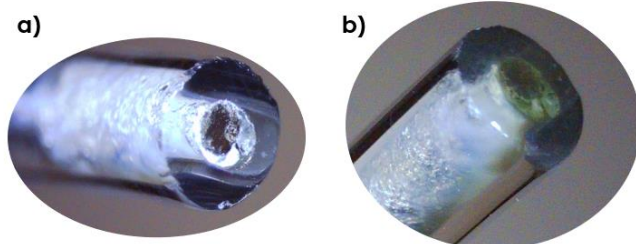
Az elkészített elektródokkal kalibrációs görbéket vettem fel. Kíváncsi voltam egyrészt a mérési tartományra, másrészt az elektród élettartamára. Kronoamperometria és periodikusan megszakított amperometria módszerével is végeztem méréseket. A mérési eredményeimet az elektródok szerint csoportosítva szeretném bemutatni.

Általánosságban elmondható, hogy mindegyik elektród ~1 hétig működött. A PIA mérések kevésbé voltak zajosak. A méréseket 3 vagy 5 mL foszfát pufferben végeztem (0,1 M, pH 7,4) ezüst/ezüst-klorid referencia elektróddal és platina ellenelektróddal. A fél mm platinaszálat tartalmazó nagyobb (1,5 mm külső átmérőjű) elektródok esetén kevertem az oldatot, míg a mikroelektródoknál csak a glükóz oldat hozzáadása után, az elkeveredés biztosítására kevertettem meg ~1 másodpercig. Különböző töménységű glükóz-oldatokat használtam, így a mérések bemutatásánál, ahol szükséges, feltüntetem, hogy a mért oldat a hozzáadás után milyen koncentrációban tartalmazott glükózt.

NAGYOBB ELEKTÓD ENZIMRÉTEGÉNEK KÉSZÍTÉSE AKRILLAL

Az első bemutatott elektród kivételt képez, ez a poliakrilamidós réteg kipróbálásához készült. 7. napon még mért, azonban utána már nem válaszolt glükóz-hozzáadásokra.

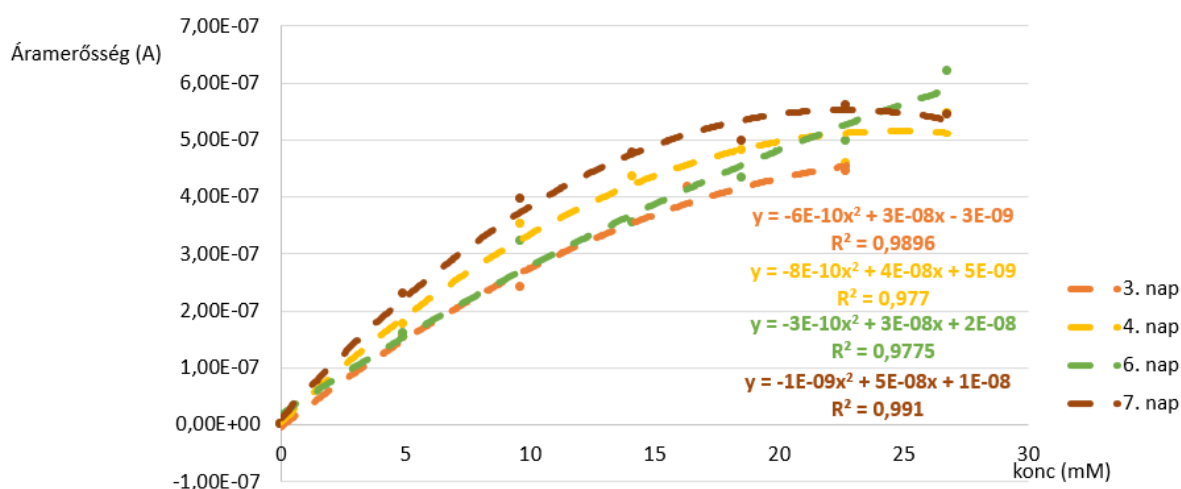
Az elektród elkészültekor az enzimiréteg még sárga színű volt, majd kifehéredett.



Külső átmérő:	1,5 mm
Platinaszál átmérője:	0,5 mm
Enzimiréteg típusa:	poliakril
Megjegyzés:	működésének 7. napján készült a kép

17. ábra: Enzimiréteg előtt és után

- az elektród felületén már van méretkizárásos réteg, de az enzimiréteget még nem tettem rá
- a sárgás színű terület a platina felületén a frissen felvitt enzimiréteg

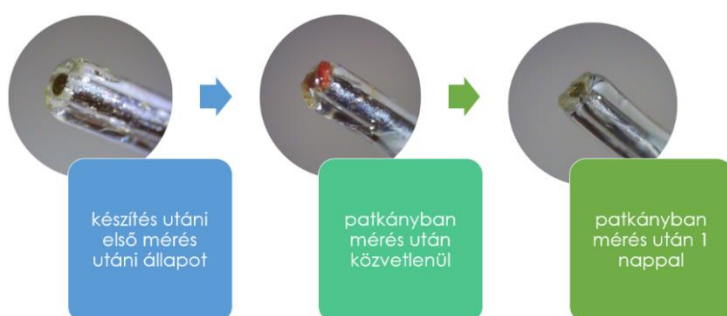


18. ábra: Kalibrációs görbe, 0,5 mm Pt, akrilos enzimiréteg, kronoamperometriás mérések

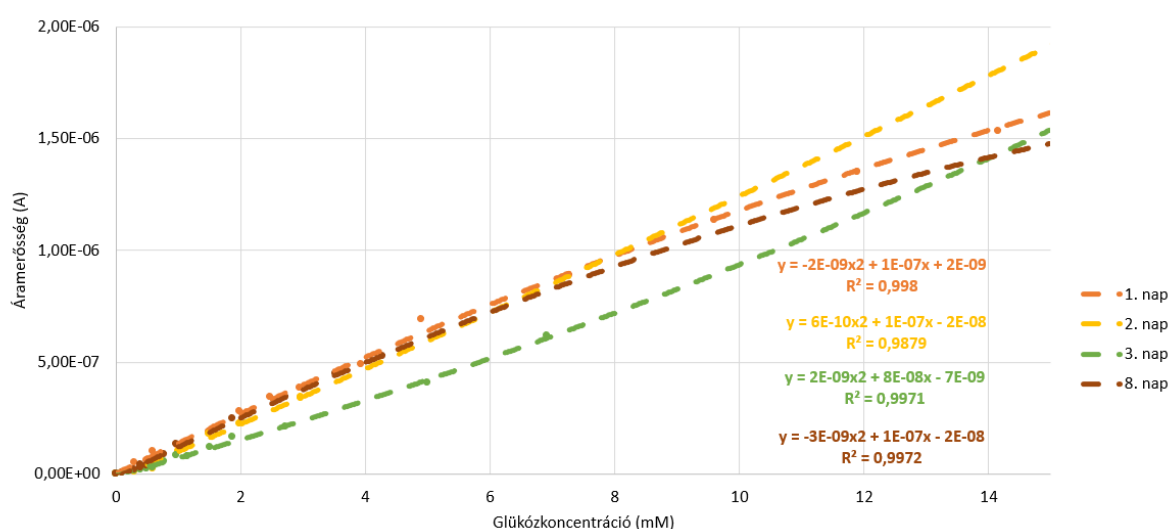
NAGYOBB ELEKTÓD ALBUMINOS GÉLLEL KÉSZÍTETT ENZIMRÉTEGE

Ez az elektród a nyolcadik napon mért utoljára. Működésének második napján állatban mérésre használtam (állatkísérlet részleteit lásd később). Digitális nagyító alatt folyamatosan követtem az enzimiréteget, melyet az alábbi képeken bemutatok. Az elektródot a kalibrációs mérések között fiziológiás sóoldatban tároltam 4 °C-on, illetve patkányban minden mérés után desztillált vízzel mostam le.

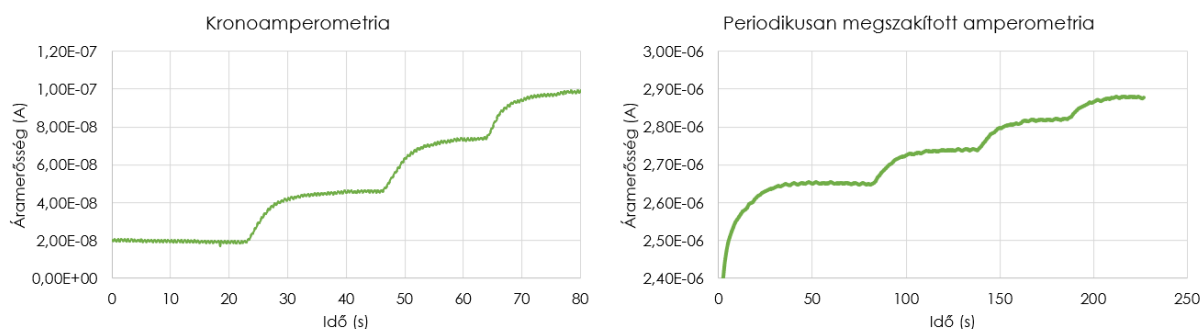
Közvetlenül az állatban történő mérés előtt kalibrációs görbéket vettem fel PIA-t és kronoamperometriát is használva, így a két mérési módszer is összehasonlítható. A PIA-val 130-140-szeres jelerősítést értem el a kronoamperometriához képest.



19. ábra: Géles enzimiréteg változása képeken



20. ábra: kalibrációs görbe, 0,5 mm Pt, albumin géles enzimiréteg, kronoamperometria

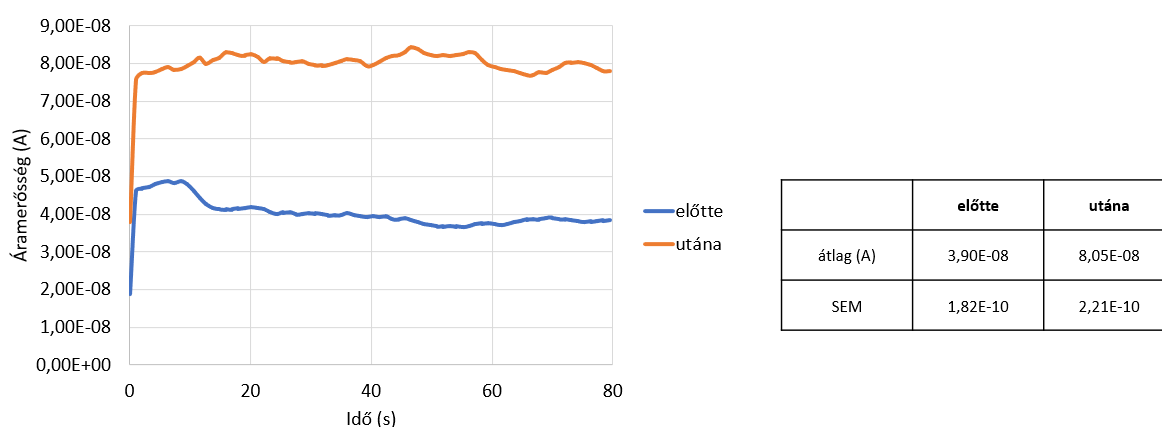


	Elért glükózkoncentráció (mM)	CA		PIA		jelerősítés mértéke
		Átlag (A)	SEM	Átlag (A)	SEM	
alap	0	1,98E-08	3,54E-11	2,65E-06	2,03E-10	133
első hozzáadás	0,39	4,54E-08	6,86E-11	2,74E-06	3,44E-10	138
második hozzáadás	0,78	7,31E-08	9,19E-11	2,82E-06	5,36E-10	142
harmadik hozzáadás	1,15	9,82E-08	1,27E-10	2,88E-06	3,93E-10	145

21. ábra: Kronoamperometria (CA) és periodikusan megszakított amperometria (PIA) összehasonlítása

Az irodalmi adatok elég hiányosak a patkányagiban mért fiziológiás extracelluláris glükózkoncentráció tartományát illetően. Abban a tanulmányban, melyet korábban idéztem (Fellows et al., 1992), 0,5 mM alatti koncentrációt találtak a kezelés előtti kontroll-csoportnál. A kalibrációs görbék felvételénél így a 2 mM alatti tartományra koncentráltam, itt több mérést végeztem, hogy az állatban mért értéket minél pontosabban meg tudjam határozni. A kísérletben először mértem az enzim nélküli elektróddal, majd az enzim elektróddal. Az állat ezután kapott intraperitonálisan 1 mg glükózt tartalmazó oldatot (0,5 mL térfogatban), majd 25 perc múlva újra mértem az enzimet tartalmazó elektróddal.

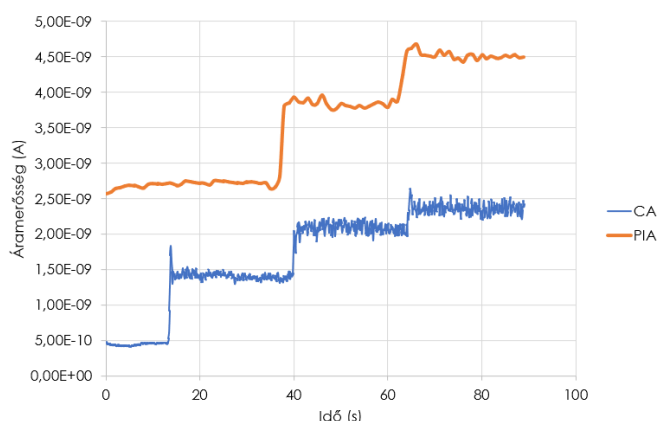
A mért értékek 4-4,5 mM közé esnének, ha a kalibrációs görbén ez a tartomány még lineáris lenne. Az elektródra kerülő enzim mennyisége még egy optimalizálendő pont a jövőbeni mérések előtt. A glükóz injekció előtti és utáni görbét azonban érdemes bemutatni, a glükóz-injekció 2,07-szeres jelnövekedést okozott.



22. ábra: PIA glükóz-injekció előtt és után PFC-ben

MIKROELEKTRÓDOK

A 25 μm -es platinát tartalmazó elektródot arra használtam, hogy beállítsam a PIA paramétereit, és meg lehessen nézni az agyban okozott kárt. A kalibrációs görbe lineáris szakasza itt sem fedti a kívánt céltartományt, de a mért érték itt is 4-4,5 mM közé esik. Kronoamperometria és PIA között az alapnál hatszoros, aszkorbinsav-oldat hozzáadásoknál kétszeres jelerősítést értem el.



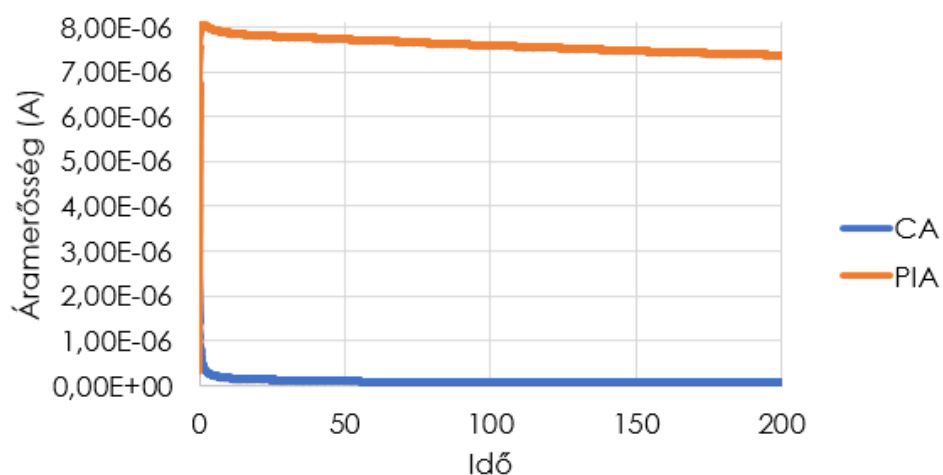
	glükózkoncentráció (mM)	CA		PIA		erősítés mértéke
		átlag [A]	SEM	átlag [A]	SEM	
alap	0	4,46E-10	1,63E-11	2,71E-09	2,87E-11	6,08
első hozzáadás	2,72	1,40E-09	4,24E-11	3,83E-09	5,14E-11	2,73
második hozzáadás	5	2,09E-09	6,95E-11	4,50E-09	3,68E-11	2,15
harmadik hozzáadás	6,92	2,36E-09	7,00E-11	5,03E-09	5,76E-11	2,13



23. ábra: Jelerősítés mikroelektródnál

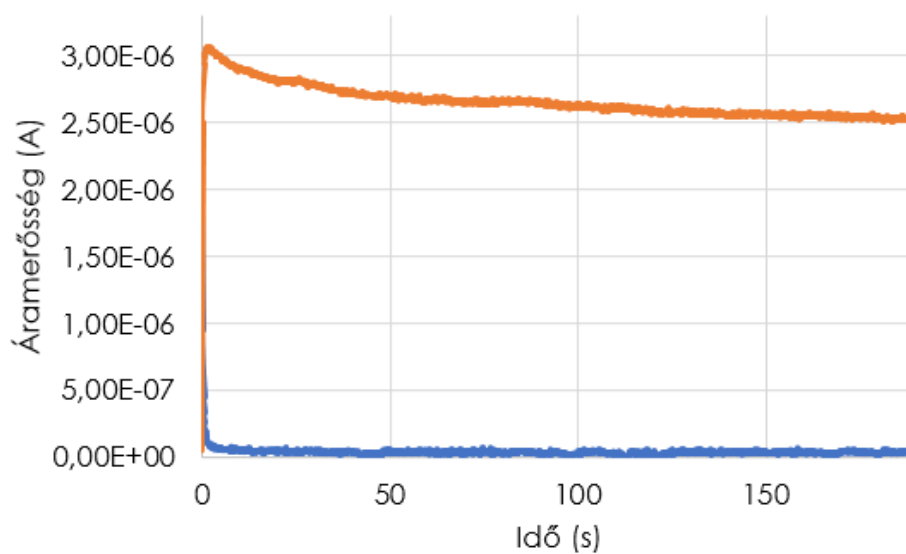
Második és egyben utolsó próbamérésnél 100 μm -es platinát tartalmazó elektródokat készítettem.

Az enzim nélküli elektróddal foszfát pufferben (PBS) **százszoros jelerősítést** értem el a periodikusan megszakított amperometriával, és ugyanez látható az állatban mérve is.



CA		PIA	
átlag 150-200s között (A)	SEM	átlag 150-200s között (A)	SEM
7,39E-08	8,96E-11	7,43E-06	1,15E-09

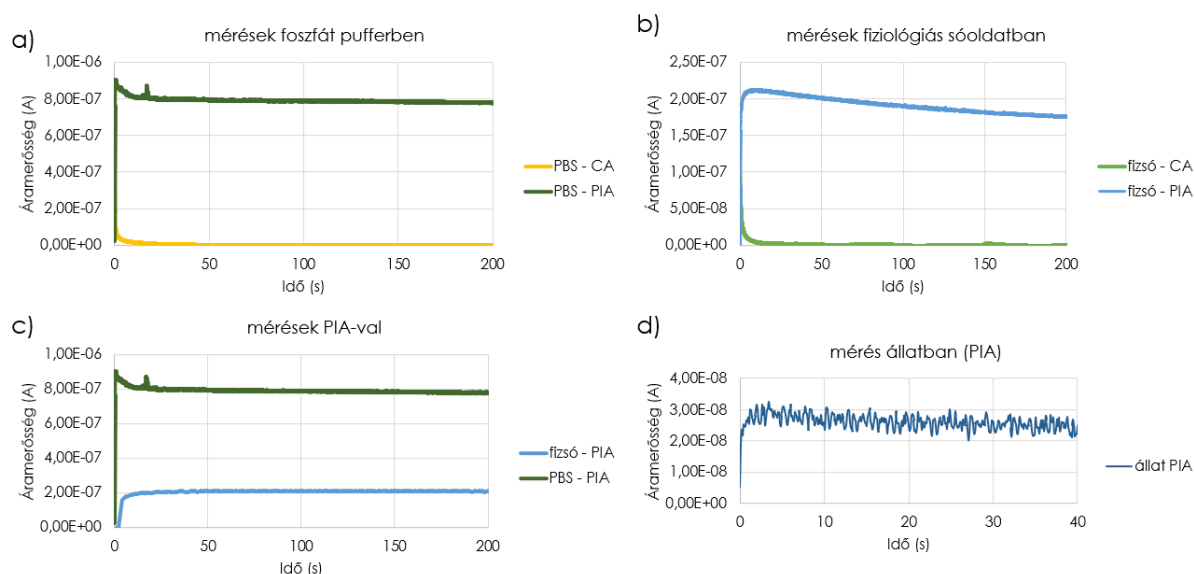
24. ábra: Jelerősítés mértéke foszfát pufferben



CA		PIA	
átlag 150-200s között (A)	SEM	átlag 150-200s között (A)	SEM
3,52E-08	4,37E-10	2,54E-06	6,91E-10

25. ábra: Jelerősítés állapotban mérve

Az elektród enzimréteget tartalmazó párjával szintén mértem foszfát pufferben is, illetve fiziológiás sóoldatban. Mérés előtt in vitro felvettem kalibrációs görbéket majd mértem az állatban a PFC meghatározott területén (koordinátákat lsd. később).



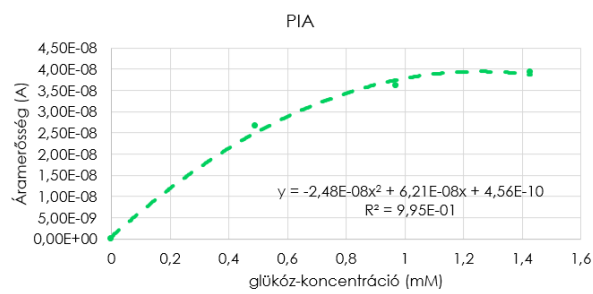
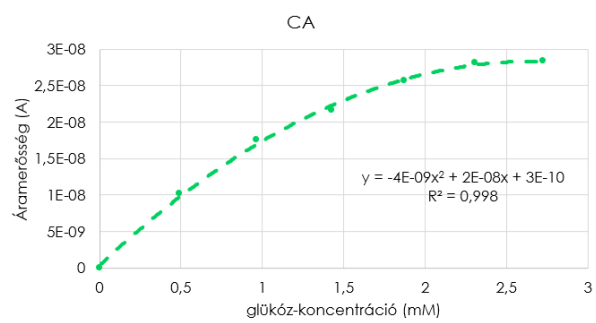
26. ábra: Mérések mikroelektróddal

- A jelerősítés mértéke 476-szoros volt
- 317-szeres jelerősítést eredményezett a periodikusan megszakított amperometria használata
- periodikusan megszakított amperometria módszerével négyszeresére nőtt az áramerősség

5. táblázat: mérések átlagai

	fiziológiás sóoldat		PBS	
	átlag (20 - 200 s)	SEM	átlag (20 - 200 s)	SEM
CA	5,99E-10	2,05E-11	1,65E-09	4,38E-11
PIA	1,89E-07	2,31E-10	7,89E-07	1,38E-10

Állatban a fentieknél rövidebb mérést alkalmaztam. A cél egy 30 másodperces értékelhető szakasz felvétele volt, ezért 40 másodpercre állítottam a mérést, melynél az első 10 másodpercet az átlag számításakor nem vettem figyelembe. A mérés átlaga $2,56 \times 10^{-8} \text{ A} \pm 1,16 \times 10^{-10} \text{ SEM}$. A kalibrációs görbe alapján ez **0,675 mmol/L** koncentrációnak felel meg. A kalibrációs görbe alapján az elektród a 0-2 mmol/L tartományban tud pontosan mérni, ez esik a lineáris szakaszra. Kalibrációt CA-val, és PIA-val is végeztem, de állatban csak PIA-val mértem. Ezzel párhuzamosan a gyári szenzor által mért szöveti glükózkoncentráció 12 mmol/L volt.



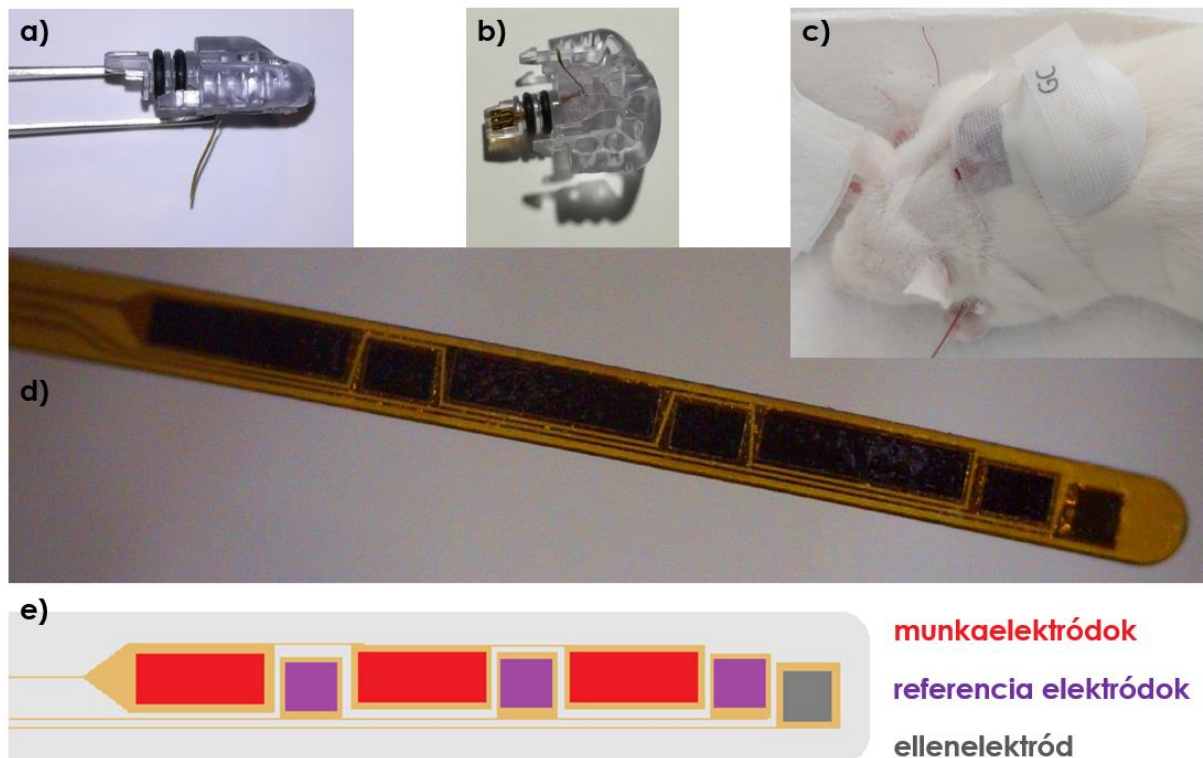
27. ábra: kalibrációs görbék

IN VIVO GLÜKÓZ MÉRÉSEK GYÁRI SENZORRAL

Saját készítésű elektród mellett gyári szenzorokkal is végeztünk méréseket, az agyi mérésekkel párhuzamosan a szenzort bőr alatti zsírszövetbe vezetve a perifériás glükóz-szintet is tudtuk regisztrálni.

A gyári, folyamatos szöveti cukorszintet monitorozó készülékek agyi mérésekre nem alkalmasak, mert a méréstartományuk 2,22 mmol/l-felett kezdődik, illetve az érzékelőjük sem kis területekre van optimalizálva (lásd korábban a mérni kívánt agyterület mérete). Viszont használatuk lehetővé teszi a perifériás és agyi cukorszintek összehasonlítását.

A perifériás mérések során Medtronic gyártmányú, Guardian 3 típusú, folyamatos glükóz-monitorozó szenzort használtunk (Medtronic Hungária Kft., Budapest, <https://www.medtronic-diabetes.com/hu-HU/>). A szenzor kis méretű műanyag házából és a kilógó hajlékony nyomtatott áramköri lapból áll. A lap felszínén helyezkednek el az elektródok. A szenzor egy távadóhoz csatlakoztatva Bluetooth-on keresztül kommunikál a Connect nevű telefonos applikációval, mely valós időben mutatja a mért cukorértéket.

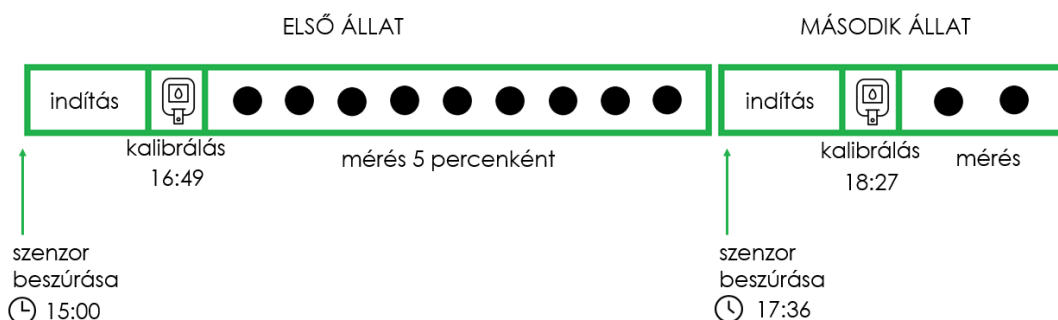


28. ábra: Gyári glükóz szenzor

- a) gyári szenzor oldalnézetből
- b) gyári szenzor alulnézetből
- c) a beszűrt szenzort és a csatlakoztatott távadót az altatott patkányhoz rögzítettük, ezzel minimalizálva az elmozdulás esélyét
- d) a szenzor elektródrendszer digitális nagyítóval fényképezve
- e) az elektródrendszer sémás ábrája

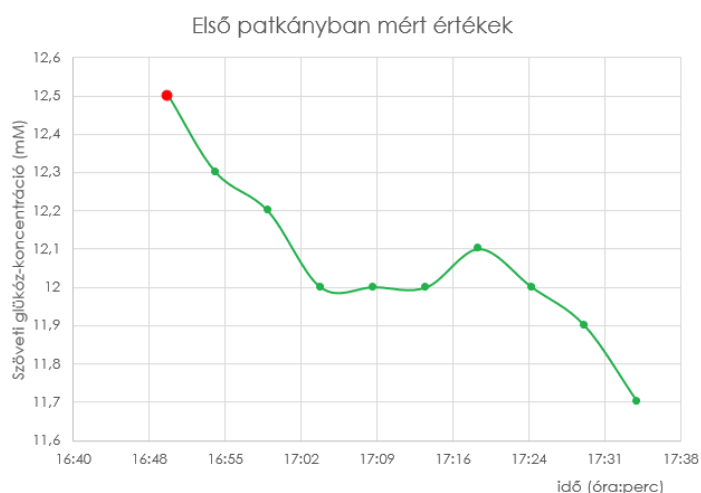
Az állatkísérletek szempontjából hátránya, hogy minden egyes behelyezés, újracsatlakoztatás után az indítási fázisa akár két óráig is eltarthat. Eddigi tapasztalataink alapján ehhez körülbelül másfél óra volt ténylegesen szükséges. Az indítás után egy manuális kalibrálás szükséges, melyet DCont Trend vércukormérővel végeztünk, vért a patkány farokvénájából vettünk.

A mért adatok a CareLink rendszeréből pontos időbélyegekkel ellátva egy .csv fájlban letölthetőek. Ebből látszik, hogy a szenzor 5 percenként vesz fel újabb értéket.



29. ábra: Egy kísérletünk idővonala

Idő	első állatban mért szöveti cukorértékek (mM)	második állatban mért szöveti cukorértékek (mM)
16:49:50	12,5	
16:54:18	12,3	
16:59:18	12,2	
17:04:18	12	
17:09:18	12	
17:14:18	12	
17:19:18	12,1	
17:24:18	12	
17:29:18	11,9	
17:34:18	11,7	
18:27:44		17,5
18:30:41		17,5
18:35:41		17,5



30. ábra: a szenzorral mért értékek

A pirossal jelölt értékeket kalibrációkor mértem.

A fenti mérés közben az állatot sztereotaxiás készülékben rögzítettük. Így a szöveti glükóz-méréssel párhuzamosan lehetőség van a saját készítésű elektróddal mérni az agyból.



31. ábra: próbamérés állatban

ÁLLATKÍSÉRLETES PRÓBAMÉRÉSEK EREDMÉNYEI

Az elektródok tényleges felhasználhatóságát pilot kísérletekben ellenőrizzük. In vivo, állatban végzett próbamérés során derülhetnek ki azok a hibák/hiányosságok, amikre addig nem gondoltunk. Néhány olyan kérdés is felmerült, melyre másképp nem lehetett választ kapni. Ebben a részben bemutatom a kísérleti összeállítást és összegzem azokat a tapasztalatokat, melyeket a próbamérések során szereztem.

ÁLLATOK KEZELÉSE

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk, kb. 8 hetes korban, amiket felhasználásuk előtt kontrollált körülmények között csoportban tartottunk (részleteket lásd (László et al., 2022)). Az állatokat az intézményi (PTE 84033-6/2020), nemzeti (40/2013. (II. 14.) Magyar Korm. rendelet), és nemzetközi szabványoknak megfelelően (Európai Közöségi Tanács irányelve, 86/609/EGK, 1986, 2010 kezeltük).

A patkányokat 20% uretán (05ml/100g ip) mélyaltatásban fixáltuk a sztereotaxiás készülékbe. A fejbőr és lágyrészecskék átvágása után a bregmától (sagittális és coronális koponyavarratok találkozási pontja) tizedmilliméter pontossággal Paxinos patkány agyatlasz alapján mértük ki a célterület koordinátáit a koponyán. Ezt követően fogászati fúróval átfúrtuk a koponyacsontot, majd ráhelyeztük – szintén tizedmilliméter pontossággal – mikromanipulátor segítségével az elektródot. A méréshez egyrészt levezettem a célterületre a munkaelektródot (ez vagy 1,5 mm vagy 1 mm átmérőjű üvegkapillárisban volt), illetve a mérési területtől távolabb is fúrtunk egy lyukat, ahova a referencia és ellenelektród szerepét betöltő 250 µm-es ezüstszálat vezettem. Legelső próbamérésnél még a műtét utolsó lépéseként rögzítettünk egy kisméretű csavart is a csontba, hátha szükség lesz rá földeléshez. Végül elégségesnek bizonyult a fém sztereotaxiás készülék földelése.

A gyári szenzort a tarkóbőr alá szúrtuk be és ragasztócsíkkal rögzítettük az állathoz, hogy ne tudjon kimozdulni, amíg az állatot mozgatjuk vagy az elvezetéseket rögzítjük.

A kísérletek, a mérések befejezése után, túlaltatással végződtek, majd az állatokat transzkardiálisan előbb foszfát pufferrel, majd 4% paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk és az agyat kivéve azt további 24h-ig 4%PFA-ban, majd cukros PBS-ben tároltuk. A cukor alkalmazására azért volt szükség, hogy a fagyasztva metszés során a fagyasztás jégkristályokat okozó roncsoló hatását elkerüljük. Szánkamikrotómmal az agyakból 30µm-es metszeteket készítettünk, majd ezt Nissl festéssel megfestettük az általános protokoll szerint.

AZ ÁLLATKÍSÉRLET SORÁN MEGVÁLASZOLANDÓ KÉRDÉSEK

A saját fejlesztésű elektródok szempontjából fontos kérdés, hogy az enzimréteg az elektródról nem válik-e le amikor kiveszem az állatból, és az elektród újra felhasználható-e másik állatban vagy ugyanazon állat másik agyterületén?

- A választott módszerekkel az enzimréteg nem vált le, az elektród újrahasználatos volt más agyterületen is.

Mennyire zajos a mérés, kell-e egy plusz csavart rögzíteni a koponyacsontba földeléshez vagy elég, ha a sztereotaxiás készüléket földelem?

- Úgy tűnt, elég a sztereotaxiás készülék földelése

Mekkora sértést okoz az agyba vezetett elektród?

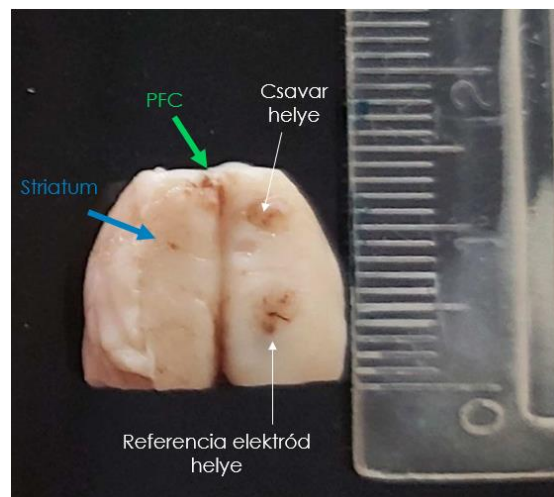
- A metszeteken látható, hogy a másfél mm-es elektród elég nagy területen roncsolt, azonban az 1 mm-es vékony kapilláris helye alig látható. Második próbamérés során a vastagabb elektródot már nem is használtam.

A képen látható, milyen sérülést okozott a két elektród. Ez az első mérésből származó agy, itt a csavar is nyomot hagyott az agy felszínén. A referencia elektród viszonylag nagy sérülést okozott, de az annak tudható be, hogy többször kivettem és visszatettem a KCl oldatba a mérések között (például az a másfél-két óra idejére, amíg a gyári szenzor indulására vártunk).

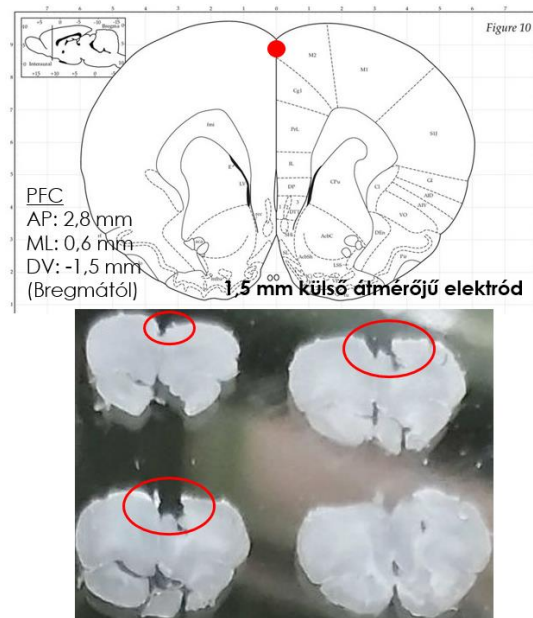
Első mérésnél a PFC-ben (**33. ábra**) a másfél mm-es elektróddal mértem. A metszeteken piros ellipszissel jelöltem a sérülést, melyet az elektród okozott.

A striátumban (**34. ábra**) használtam az 1 mm-es külső átmérőjű elektródot. Az agy felszínén is csak egy apró pont jelöli a helyét, és a metszeten sem látható nagy sértés. A függőleges piros vonalaktól balra látszik a szúrt csatorna, és a vízszintes piros jelleg tart.

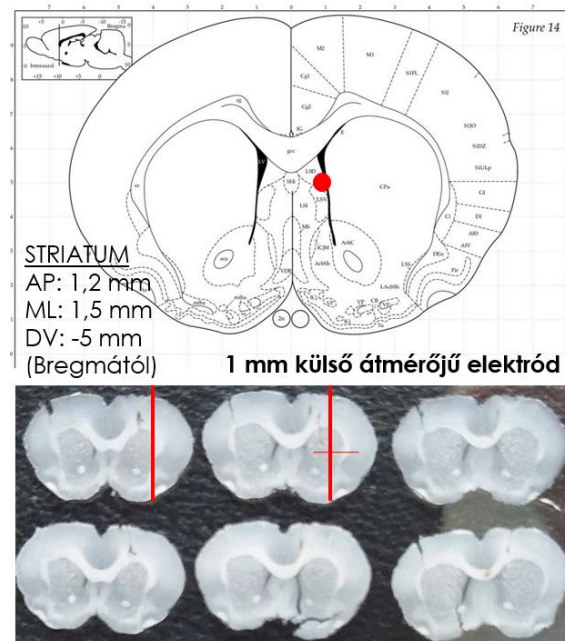
Az atlasz ábrákat az online elérhető agyatlasz felhasználásával készítettem. (Paxinos, George, and Charles Watson. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Az online verzió Matt Gaidica munkája. <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/>)



32. ábra: patkány agy felszínén látható sérülések



33. ábra: Mérés helye a prefrontális kéregben atlasz ábrán és metszeten



34. ábra: Mérés helye a striátumban atlasz ábrán és metszeten

Ezekon kívül a gyári szenzor használatát és működésének sajátosságait is meg kellett tanulnunk az „éles” kísérletek előtt. A gyári szenzorral kapcsolatos tapasztalatokat az előző fejezetben mutattam be.

TOVÁBBI TERVEK

A közeljövőben az eddigi tapasztalatok alapján a mérési tartomány további optimalizálását tervezem, például töményebb gél készítésével vagy nagyobb mennyiségű gél felvitelével.

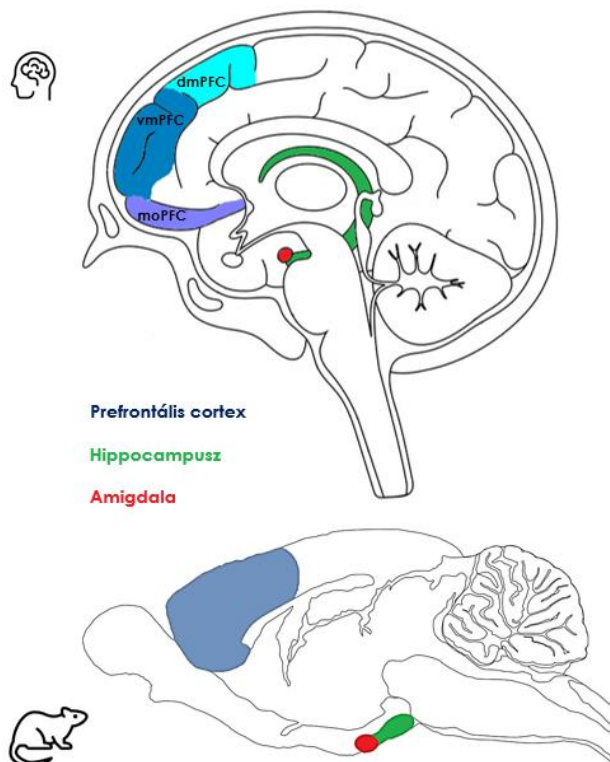
A glükózváltozások gyorsabb monitorozása érdekében a jugularis vénába kanült tervezünk behelyezni, így egyrészt közvetlenül centrális vénába juttathatjuk az oldatot, valamint gyorsabb változást is tudunk regisztrálni. Glükózon kívül inzulinnal is tervezzük a cukorszintek manipulációját.

Eddigi méréseinknél a PFC-re fókuszáltunk, ez a terület a későbbiekben is a középpontban van. Az elektródot PTSD modell használatához fejlesztettem, a kórkép hátterében pedig feltételezésünk alapján a stressz-szabályozás struktúráinak kóros működése áll.

PTSD-szerű tünetek kiváltására patkányoknál egyszeri alkalommal elektromos lábsokkot alkalmazunk. PTSD-szerű tünetnek tekintjük patkányoknál a traumás környezetbe visszahelyezéskor megfigyelhető dermedő magatartást. A kontroll állatokat nem sokkoljuk. A két csoport között különbséget várunk a PFC területén mérhető glükózkoncentrációban. A mérési módszer valószínűleg nem teszi lehetővé alapszintek közötti különbség detektálását (pl nem pontosan ugyanazon területet tudjuk két állatban eltalálni), de a kihívásokra adott választ (glükóz terhelés, inzulin) össze tudjuk majd hasonlítani.

Az Élettani Intézet munkatársai korábbi kutatásaik során már publikáltak glükózmonitorozó sejtekkel kapcsolatos eredményeket ezen az agyterületen (Nagy et al., 2016; Szabó et al., 2018).

Metabolikus eltéréseket egyre több kórkép (például Alzheimer-kór, epilepszia) hátterében igazolnak, kísérleteink során szeretnénk az elektrokémia módszereit felhasználva a poszttraumás stressz-zavar metabolikus vonatkozásait ez irányban tovább vizsgálni.



35. ábra: Stresszadaptáció agyi struktúrái

ÖSSZEFOGLALÁS

Sikerült in vivo mérésre alkalmas, (jelen kísérletünkben patkányagy meghatározott agyterületén való mérésre is alkalmas) amperometriás bioszenzort készítenem. Az alkalmazott periodikusan megszakított amperometriás mérőmódszer megnöveli a jelintenzitást és kevésbé zajos mérést tesz lehetővé. Állatban a glükóz beadást követően szintén láthatóvá vált a jelnövekedés az agyterületen. Gyári szenzor segítségével sikeres volt az agyi glükóz mérésen túl a szövetközi glükóz-szintek párhuzamos, jelen idejű monitorozása. A módszer – némi további finomítás után – alkalmas lehet neurológiai-pszichiátriai betegségek állatmodelljeiben az agy anyagcseréjének jobb megértésére.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen munka nem készülhetett volna el témavezetőim szakmai és emberi támogatása nélkül.

Köszönöm **Dr. Nagy Géza** Professzornak, hogy megismerhettem a mikroelektródok készítését és működését és a munkám során nyújtott támogatását.

Az elektrokémiával kapcsolatos labormunka során köszönöm **Dr. Nagyné Dr. Zengő Livia** Tanárnő építő jellegű tanácsait, észrevételeit.

Péliné Dr. Kovács Anitának és **Prof. Dr. Zelena Dórának** köszönöm az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott segítségüket és a kutatás egésze alatti támogatásukat.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP	anteroposterior
CA	kronoamperometria
CV	ciklikus voltammetria
DV	dorzóventrális
GLUT2	glükóz transzporter 2
HA	hozzáadás
KÜL	különbség
ML	mediolaterális
MKR	méretkizárásos réteg
mPDA	meta-fenilén-diamin
PBS	foszfát puffer – phosphate buffer saline
PFA	paraformaldehid
PFC	prefrontális cortex
PoCT	betegágy melleti laboratóriumi diagnosztika – point of care testing
PTSD	poszttraumás stresszavar
SEM	az átlag szórása – standard error of the mean
SEMD	az átlagok különbségének szórása – standard error of the mean difference

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra: Első generációs glükóz-szenzorok működése	- 8 -
2. ábra: Második generációs glükóz-szenzorok működése	- 8 -
3. ábra: Harmadik generációs glükóz-szenzorok működése	- 9 -
4. ábra: 3D molekula-modellek; https://molview.org	- 10 -
5. ábra: Michaelis-Menten kinetika	- 11 -
6. ábra: Elektrodok	- 13 -
7. ábra: Elektrokémiai módszerek csoportosítása	- 14 -
8. ábra: Elektrokémiai cella felépítése	- 14 -
9. ábra: Kronoamperometria (CA)	- 15 -
10. ábra: Periodikusan megszakított amperometria (PIA)	- 16 -
11. ábra: poli-mPDA ultravékony réteg készítése és tesztelése 25 μ m-es platinát tartalmazó elektródnál	- 16 -
12. ábra: mPDA monomer szerkezete és polimer-térháló egy síkban	- 17 -
13. ábra: poli-mPDA rétegessége	- 18 -
14. ábra: 4 mód a méretkizárásos réteg létrehozására	- 18 -
15. ábra: Aszkorbinsav-oldat hozzáadások görbéi	- 20 -
16. ábra: Elektrodok sémás ábrája és működése	- 22 -
17. ábra: Enzimiréteg előtt és után	- 24 -
18. ábra: Kalibrációs görbe, 0,5 mm Pt, akrilos enzimiréteg, kronoamperometriás mérések	- 24 -
19. ábra: Géles enzimiréteg változása képeken	- 25 -
20. ábra: kalibrációs görbe, 0,5 mm Pt, albumin géles enzimiréteg, kronoamperometria	- 25 -
21. ábra: Kronoamperometria (CA) és periodikusan megszakított amperometria (PIA) összehasonlítása	- 26 -
22. ábra: PIA glükóz-injekció előtt és után PFC-ben	- 26 -
23. ábra: Jelerősítés mikroelektrodnál	- 27 -
24. ábra: Jelerősítés mértéke foszfát pufferben	- 28 -
25. ábra: Jelerősítés állatban mérve	- 28 -
26. ábra: Mérések mikroelektroddal	- 29 -
27. ábra: kalibrációs görbék	- 30 -
28. ábra: Gyári glükóz szenzor	- 31 -
29. ábra: Egy kísérletünk idővonala	- 32 -
30. ábra: a szenzorral mért értékek	- 32 -
31. ábra: próbamérés állatban	- 32 -
32. ábra: patkány agy felszínén látható sérülések	- 34 -
33. ábra: Mérés helye a prefrontális kéregben atlasz ábrán és metszeten	- 34 -
34. ábra: Mérés helye a striátumban atlasz ábrán és metszeten	- 35 -
35. ábra: Stresszadaptáció agyi struktúrái	- 36 -

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat: egy bioszenzor részei.....	- 6 -
2. táblázat: Méterkizárásos rétegek összehasonlítása.....	- 19 -
3. táblázat: két mód az enzimréteg készítéséhez	- 21 -
4. táblázat: Megoldások.....	- 22 -
5. táblázat: mérések átlagai	- 29 -

HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

- Adlard, B. P. F., de Souza, S. W., & Moon, S. (1973). THE EFFECT OF AGE, GROWTH RETARDATION AND ASPHYXIA ON ASCORBIC ACID CONCENTRATIONS IN DEVELOPING BRAIN. *Journal of Neurochemistry*, 21(4), 877-881. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07532.x>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays Biochem*, 60(1), 1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3), 527-605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Chefer, V. I., Thompson, A. C., Zapata, A., & Shippenberg, T. S. (2009). Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 7, Unit7.1. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0701s47>
- CLARK, L. C., & LYONS, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*, 102, 29-45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- Cremer, M. (1906). Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von polyphasischen Elektrolytketten. *Zeitschrift für Biologie*, 47, 562-608.
- Fellows, L. K., Boutelle, M. G., & Fillenz, M. (1992). Extracellular brain glucose levels reflect local neuronal activity: a microdialysis study in awake, freely moving rats. *J Neurochem*, 59(6), 2141-2147. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10105.x>
- Gonon, F., Buda, M., Cespuaglio, R., Jouvét, M., & Pujol, J. F. (1981). Voltammetry in the striatum of chronic freely moving rats: detection of catechols and ascorbic acid. *Brain Res*, 223(1), 69-80. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90807-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90807-6)
- Grünewald, R. A. (1993). Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 18(1), 123-133. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90010-w](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90010-w)
- Guilbault, G. G., & Montalvo, J. G. (1969). A urea-specific enzyme electrode. *J Am Chem Soc*, 91(8), 2164-2165. <https://doi.org/10.1021/ja01036a083>
- Hornig, D. (1975). Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann N Y Acad Sci*, 258, 103-118. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29271.x>
- Hughes, W. S. (1922). THE POTENTIAL DIFFERENCE BETWEEN GLASS AND ELECTROLYTES IN CONTACT WITH THE GLASS. *Journal of the American Chemical Society*, 44(12), 2860-2867. <https://doi.org/10.1021/ja01433a021>
- Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2019). The Pharmacokinetics of Vitamin C. *Nutrients*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/nu11102412>
- László, K., Vörös, D., Kiss, O., László, B. R., Ollmann, T., Péczely, L., . . . Lénárd, L. (2022). The Role of Intraamygdaloid Oxytocin and D2 Dopamine Receptors in Reinforcement in the Valproate-Induced Autism Rat Model. *Biomedicines*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092309>
- Monteiro, T., & Almeida, M. G. (2019). Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions for New Problems. *Crit Rev Anal Chem*, 49(1), 44-66. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1461552>
- Murphy, L. J. (1998). Reduction of Interference Response at a Hydrogen Peroxide Detecting Electrode Using Electropolymerized Films of Substituted Naphthalenes. *Analytical*

- Chemistry*, 70(14), 2928-2935.
<https://doi.org/10.1021/ac971182r>
- Nagy, B., Szabó, I., Takács, G., Csetényi, B., Hormay, E., & Karádi, Z. (2016). Impaired glucose tolerance after streptozotocin microinjection into the mediodorsal prefrontal cortex of the rat. *Physiol Int*, 103(4), 403-412.
<https://doi.org/10.1556/2060.103.2016.4.5>
- Nagy, L., Kálmán, N., & Nagy, G. (2006). Periodically interrupted amperometry. A way of improving analytical performance of membrane coated electrodes. *J Biochem Biophys Methods*, 69(1-2), 133-141.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.03.013>
- Nagy, L., Nagy, G., Gyurcsányi, R. E., Neuman, M. R., & Lindner, E. (2002). Development and study of an amperometric biosensor for the in vitro measurement of low concentration of putrescine in blood. *J Biochem Biophys Methods*, 53(1-3), 165-175.
[https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(02\)00105-7](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(02)00105-7)
- Naikoo, G. A., Awan, T., Salim, H., Arshad, F., Hassan, I. U., Pedram, M. Z., . . . Tambuwala, M. M. (2022). Fourth-generation glucose sensors composed of copper nanostructures for diabetes management: A critical review. *Bioeng Transl Med*, 7(1), e10248.
<https://doi.org/10.1002/btm2.10248>
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 9613090.
<https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
- Patole, M. S., Swaroop, A., & Ramasarma, T. (1986). Generation of H₂O₂ in brain mitochondria. *J Neurochem*, 47(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb02823.x>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv*, 30(3), 489-511.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- Severinghaus, J. W., & Astrup, P. B. (1985). History of blood gas analysis. I. The development of electrochemistry. *J Clin Monit*, 1(3), 180-192.
<https://doi.org/10.1007/BF02832259>
- Szabó, I., Hormay, E., Csetényi, B., Nagy, B., Lénárd, L., & Karádi, Z. (2018). Multiple functional attributes of glucose-monitoring neurons in the medial orbitofrontal (ventrolateral prefrontal) cortex. *Neurosci Biobehav Rev*, 85, 44-53.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.024>
- Wilson, L. R., Panda, S., Schmidt, A. C., & Sombers, L. A. (2018). Selective and Mechanically Robust Sensors for Electrochemical Measurements of Real-Time Hydrogen Peroxide Dynamics in Vivo. *Anal Chem*, 90(1), 888-895.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03770>