



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Mikroméretű, idegszövetbe ültethető elektródok funkcionalitásának javítása felkonvertáló nanorészecskékkel

Víg Levente

Egészségügyi mérnök MSc

Budapest, 2023

Külső konzulens: **Dr. Fekete Zoltán**

MKH TTK Alvási Oszcillációk Kutatócsoport

Belső konzulens: **Dr. Szlávecz Ákos**

BME Irányítástechnika és Informatika Tanszék

Kivonat

Tudományos diákköri dolgozatom témája egy olyan szilícium-ritkaföldfém alapú nanorendszer megalkotása és karakterizálása volt, amelyen keresztül képesek lehetünk idegszövetben, in vivo, térben és időben szabályozható hatóanyag leadási feladatok elvégzésére.

Munkám nagy részét egy olyan felület funkcionálizálási eljárás megalkotása tette ki, melynek elvégzése hatékonyan reprodukálható és egy stabil nanorendszerhez vezet. Ez a rendszer egyik oldalról lantanoida maggal rendelkező felkonvertáló nanorészecskékből (UCNP/upconversion nanoparticle), míg másik oldalról egy flexibilis, platinum-iridium mérőpontokból és szilikongumi szubsztrátból álló elektrofiziológiás mérésekre alkalmas elektródhálóból épült fel.

Az említett felkonvertáló részecskék olyan speciális nanorendszerek, melyek multiréteges szerkezetűeknek és ritkaföldfém magjuknak köszönhetően képesek a kisebb energiájú (nagyobb hullámhosszú) fényt lokálisan, nagyobb energiájú (kisebb hullámhosszú) fénné átalakítani, ez az energia pedig felhasználható jelen esetben fotolabilis (fényre bomló) kötések hasítására. Kombinálva ezeket az UCNP-ket az elektródokkal, a kialakított struktúra multimodális jellemzőkkel bír. Az elektród elvezetőpontjainak segítségével be tudja tölteni eredeti szerepét, azaz elektrofiziológiás méréseket végezhetünk vele az idegszövetben, míg az UCNP-k kontrolláltan célba tudják juttatni a mért területek közelében a fényre lehasadó hatóanyagot.

A létrehozni kívánt rendszer felülete egymással kovalens kötésekkel keresztül kapcsolódó rétegből állt össze. Először egy aminoszilán burkot hoztam létre a nanorészecskéken, optimális aminopropil-trietoxiszilán (APTES) koncentrációk és reakcióidők alkalmazásával. Ezt egy biciklononin-N-hidroxiszukcinimid (BCN-NHS) megnevezésű, speciális, linker vegyülettel való hidrolizációs lépés követte. A felületkezelt részecskéket, plazmáztott, majd azid csoportokkal módosított elektrokortikográfiás (ECoG) mikroelektródokra kötöttem ki a BCN-NHS-en keresztül. Végző lépésként tetrazin alapú festékeket vittem fel a felszínre, melyek rendelkeztek azzal a fotolabilis kötéssel, melynek abszorpció (elnyelési) hullámhossza egybe esett a részecskék által felkonvertált és emittált (kibocsátott) fény

hullámhosszával. Ennek a modell hatóanyagnak a leszakadásával (uncageing) tudtam a rendszer megfelelő működését tesztelni.

A felületmódosítási folyamat egyes lépéseit különböző validálási technikáknak vetettem alá. Kontaktszög, Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiás (FTIR), pásztázó elektronmikroszkópiás (SEM), elektrokémiai impedancia spektroszkópiás (EIS) és UV/Vis spektroszkópiás méréseket végeztem el, ezekkel bizonyítva a felszíni strukturáltság létrejöttét, illetve a hatóanyag leadás tényleges végbemenetelét.

Abstract

The topic of my Students' Scientific Conference thesis was the design and characterization of a silicon - rare-earth element based nanosystem, through which we may be able to perform in vivo, spatially and temporally controllable drug delivery tasks in neural tissue.

A major part of my work has been the creation of a surface functionalization procedure, that can be efficiently reproduced and leads to a stable nanosystem. This system is composed of lanthanide-cored upconversion nanoparticles (UCNP) on one side and a flexible electrophysiological electrode consisting of platinum-iridium recording sites and a silicon rubber substrate on the other side.

These upconversion particles are specialized nanosystems that, thanks to their multi-layer structure and rare-earth core, are able to convert lower energy (higher wavelength) light photons locally into higher energy (lower wavelength) ones, which can be used to cleave photolabile (light decomposable) bonds. By combining these UCNPs with the electrodes, the resulting structure has multimodal characteristics. The electrode can perform its original role of carrying out electrophysiological measurements in the nerve tissue by means of its conduction points, while the UCNPs can target the photolabile agent in a controlled manner near the measured areas.

The surface of the system to be created was composed of layers interconnected by covalent bonds. I first created an aminosilane shell on the nanoparticles using optimal aminopropyltriethoxysilane (APTES) concentrations and reaction times. This was followed by a hydrolysis step with a specific linker compound named bicyclononin-N-hydroxysuccinimide (BCN-NHS). Via this BCN-NHS the surface-treated particles were attached to electrocorticography (ECoG) microelectrodes, that were plasmonized and then modified with azide groups beforehand. As a final step, tetrazine based dyes were applied to the surface, which possessed the photolabile bond with the absorption wavelength coinciding with the wavelength of the light converted and emitted by the particles. By uncaging this model drug, I was able to test the proper functioning of the system.

Each step of the surface modification process was subjected to different validation techniques. Contact angle, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and UV/Vis spectroscopy measurements were performed to demonstrate the formation of surface patterning and the actual progress of the drug deposition.

Rövidítések jegyzéke

APTES - NPTES: (3-Aminopropyl)triethoxysilan - (3-Azidopropyl)triethoxysilan
/ (3-Aminopropil)triethoxiszilán - (3-Azidopropil)triethoxiszilán

BCN-NHS: (1R,8S,9s)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl N-succinimid / biciklo
nonin-N-hidroxiszukcinimid

ECOG: Electrocorticography / Elektrokortikográfia

EDS: Energy-dispersive X-ray spectroscopy / Energiadiszperzív röntgenspektrosz-
kópia

EIS: Electrochemical impedance spectroscopy / Elektrokémiai impedancia spekt-
roszkópia

FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy / Fourier transzformációs infravörös
spektroszkópia

PDMS: Polydimethylsiloxane / Polidimetilsziloxán

SEM: Scanning electron microscopy / Pásztázó elektronmikroszkópia

UCNP: Upconversion nanoparticle / Felkonvertáló nanorészecske

Tartalomjegyzék

Kivonat	1
Abstract	4
Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés	9
1.1. A téma ismertetése	9
1.2. Célkitűzés	9
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. Nanorészecskékről általában	11
2.2. A felkonvertáló nanorészecskék fő tulajdonságai	12
2.2.1. Struktúrális építőkövek	12
2.2.2. Fény felkonvertálás mechanizmusa	14
2.3. Idegi jelek aktivitás vizsgálatának alapjai	14
2.3.1. Elektrofiziológiás mérésekről röviden	14
2.3.2. Az elektródok típusai és anyaguk ismertetése	15
3. Kísérleti eszközök és módszerek	17
3.1. Felhasznált nanorészecskék, vegyi anyagok és eszközök	17
3.1.1. Az alkalmazott UCNP-k paraméterei	17
3.1.2. Alkalmazott reagensek, oldószerek, eszközök	18
3.2. Mérési módszerek	18
3.2.1. Elektród felületen létrejött vegyületek vizsgálata	18
3.2.2. SEM	20
3.2.3. EIS	21
3.2.4. UV-Vis spektroszkópia	25
3.3. A módosítási folyamat összefoglalása	27

4. Eredmények, értékelés	32
4.1. Kontaktszög mérés eredményei	32
4.2. FTIR mérés eredményei	34
4.3. SEM képalkotás eredményei	36
4.3.1. Agar gél teszt	36
4.3.2. Részecske borítottság vizsgálata	37
4.3.3. EDS-el kiegészített SEM	39
4.4. EIS eredmények	40
4.5. UV/Vis spektroszkópia - hatóanyag leadás eredményei	44
5. Összefoglalás	46
Köszönetnyilvánítás	47
Felhasznált irodalom	52

1. fejezet

Bevezetés

1.1. A téma ismertetése

Témám keretein belül bepillantást nyerhettem az anyagtudomány, azon belül is a nanorészecskék és felkonvertálható nanorészecskék (UCNP) alkalmazásának világába. Megismerkedhettem az idegszövetbe ültethető flexibilis elektród struktúrák működésének elméleti hátterével és gyakorlati felhasználásával. Ezen felül olyan festékekkel foglalkozhattam melyek gyűrűs felépítésüknek köszönhetően speciális fény elnyelési és kibocsátási paraméterekkel, valamint különleges hasadási tulajdonságokkal rendelkeztek.

Munkám során irodalomkutatáson keresztül segíthettem a kutatócsoportomat, a téma jobb megértésében, illetve általam tervezett kísérleteket hajthattam végre a fentebb említett nanorészecske-elektrod-festék alrendszerek összekapcsolásának terén.

1.2. Célkitűzés

Tudományos Diákköri dolgozatom célja, hogy egyik oldalról nanorészecskékből és egy festékből, míg másik oldalról egy elektródból álló, ritkaföldfém, szilícium (részecske), platinum-iridium, szilikongumi (elektrod) és Tetrazin-Kumarin-Rhodol (festék) alapú rendszer felületét funkcionalizáljam, a módosítási lépéseket optimalizáljam, illetve a felvitt rétegeket karakterizáljam. Munkám során megpróbáltam megtalálni a legmegfelelőbb körülményeket, azaz az egyes lépésekhez tartozó vegyületek ideális alkalmazási koncentrációját, a reakciók idejét, oldószerek típusát (stb.).

A rendszer stabilitását és működőképességét különböző mérési módszerekkel próbáltam meg validálni. Kontaktszög méréssel a felület hidrofób jellegét vizsgáltam, FTIR módszer használatával a létrejött kovalens kötések infravörös elnyelését figyeltem meg, pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeket készítettem, illetve az így kapott ada-

tokon képelemzést végeztem (szegmentáció, részecske számlálás, borítottság vizsgálat) a rendszer morfológiai analíziséhez. Ezen felül a részecskék, elektród mérőpontokra gyakorolt hatását elemeztem EIS-el, illetve az UCNP-kről leszakadó festéket kísérő fény jelenséget UV/Vis spektroszkópiával tanulmányoztam.

Munkámat az alábbi, egymással összefüggő részfeladatokra tudtam osztani:

1. Szilikongumi alapú, flexibilis, micro ECoG elektródok összekötése SiO_2 (szilícium-dioxid) nanorészecskékkel.
2. Felkonvertáló nanorészecskék kötése PDMS modell, majd a micro ECoG-ok felszínére is.
3. Felületi strukturáltság vizsgálata kontaktszög és FTIR mérésekkel.
4. A rendszer morfológiai analízise, képelemzéses borítottság elemzés és a stabilitás megfigyelése SEM/EDS segítségével.
5. ECoG-ok elektrokémiai tulajdonságainak, a részecske borítottság mérőpontok viselkedésére tett hatásának tanulmányozása.
6. Modell hatóanyag felvitele az UCNP-kre, hatóanyag leadás tanulmányozása fénnel történő gerjesztés után, UV/Vis spektroszkópiával.

Projektem távlati célja, hogy modell festékek helyett valódi hatóanyag molekulákat használjak (pl.: hasadó régióval ellátott neurotranszmittereket) melyekkel kombinálva, majd in vivo idegszövetbe ültetve az UCNP bevont elektródot, a hatóanyag leszakadásával neurális aktivitást/gátlást tudjak kiváltani. A létrehozott komplex, multimodális rendszer ezáltal újszerű, egyszerre diagnosztikai és terápiás utat is megnyithat az idegtudósok számára.

2. fejezet

Irodalmi áttekintés

2.1. Nanorészecskékről általában

Bármilyen eredetű részecskét melynek mérete egy és néhány száz nanométer közé esik, nanorészecskének tekintünk [1]. Anyaguk, formájuk és méretük alapján különböző csoportokba sorolhatjuk ezeket a rendkívül kis méretű rendszereket. Lehetnek szerves (organikus) eredetűek, mint például a COVID elleni védekezéskor is használt, lipid burokkal rendelkező nanorészecskék. Ezzel szemben a szervetlen (inorganikus) nanorészecske osztályok közé például a fém, szén, kerámia, polimer vagy a kvantumpon (quantumdot) alapú nanorészecskék tartoznak [2].

Mindannyian egyedülálló fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek kis méretük, de nagy fajlagos felületük miatt. Reaktivitásuk, stabilitásuk és optikai tulajdonságaik a méretüktől, illetve alakjuktól és szerkezetüktől (összetételüktől) is egyaránt függ.

Speciális jellemzőiknek köszönhetően már régóta számos ipari és tudományos alkalmazásban használatosak, például az elektronikában, az orvostudományban (képalkotás, mágneses hipertermia, antibakteriális hatás), a környezetvédelemben (vizek, levegő, termőföld tisztítása) és az energetikában is [3]. Számomra az orvostudományon (idegtudományon) belül is legérdekesebb alkalmazási terület a gyógyszerleadásra való felhasználásuk.

In vivo alkalmazás esetén, a nanorészecskék hosszú keringési idejük és akár egyes gyógyszerekkel szembeni rezisztenciájuk miatt, még szélesebb körben használhatók hordozóként egy hatóanyag vagy örökítőanyag szállító rendszerben [4].

Természetesen az ilyen típusú rendszereknek is vannak bizonyos kihívásai, például a nanorészecskék gyártása, tárolása és szállítása is nehézségekbe ütközhet.

2.2. A felkonvertáló nanorészecskék fő tulajdonságai

A fentebb említett fém nanoanyagokon belül, még különlegesebbek a dolgozatomban témaként szolgáló felkonvertáló nanorészecskék. Ezek a lantanoida elemeken (illetve ittriumon) alapuló, multiréteges struktúrák fő tulajdonsága, hogy képesek kisebb energiájú fotonokat elnyelni, azokat lokálisan nagyobb energiájúvá átalakítani, majd emittálni. Lézerek, napelemek, analitikai szenzorok, optikai képalkotó eszközök és fotodinamikus terápia esetén is már hatékonyan tudják őket alkalmazni.

Fő előnyük egyéb nanoanyagokkal szemben az, hogy közeli infravörös (near infrared/-NIR) besugárzás után képesek látható fényt kibocsátani. A NIR fotonok autofluoreszcenciája alacsonyabb, kevésbé szóródnak és a szöveteket is mélyebben áthatolják, miközben citotoxicitásuk alacsonyabb mint a látható (Vis) és ultraibolya (UV) fényé.

Gyártásuk (szintézisük) három fő módszerrel történhet: termikus dekompozíció, hidro/solvotermikus szintézis és mikroemulzió alapú szintézis [5].

Munkám során a fentebb említett felkonvertálási mechanizmust fogom tudni kiaknázni, azaz a nagyobb energiájú fotonokat felhasználni arra, hogy egy úgynevezett fotolabilis linker régió keresztül a felszínre kötött hatóanyagot hasítsak le (szabadítsak fel) a nanorészecskékről.

2.2.1. Struktúrális építőkövek

Az alábbiakban szeretném kifejteni, hogy az említett részecskék milyen rétegekkel és ezáltal milyen funkciókkal rendelkeznek.

Érzékenyített ion Elnyeli a beérkező, gerjesztő, közeli infravörös (NIR) tartományú, azaz 780–2500 nm-es hullámhosszú fényt.

Ez a komponens csak egy 4f gerjesztett energiaállapotot (elektronpályát) tart fent, mely a vele szomszédos aktivátor ion külső héján lévő, f-f energia átmeneteivel fedésben van. Az abszorpciókor keletkező fényenergia az alapállapotba való visszatéréskor transzportálható a két komponens f pályái közt.

A legnagyobb abszorpciós keresztmetszettel rendelkező elemek az Itterbium (Yb^{3+}) és a Neodímium (Nd^{3+}). Megfelelő rácsba (mátrixba) ültetve őket, szinte a teljes energiát át tudják adni az aktivátor ionnak.

Aktivátor ion Az ultraibolya és a látható tartományú (200–380 nm és 380–780 nm-es hullámhosszú) nagyobb energiájú fény kibocsátásáért felelős. Ez maga a lumineszcens

centrum.

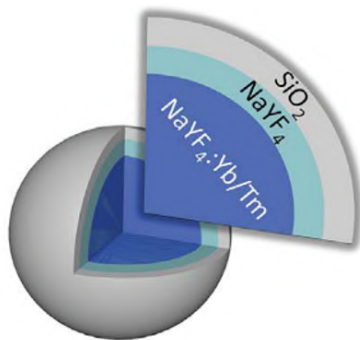
Az érzékenyített ion alapállapotba való visszatérésekor a keletkező energia átkerül és megoszlik az aktivátor ion f-f energiaszintjei közt. Mikor ezek is alapállapotba térnek vissza UV/látható tartományú fotonok lépnek ki a rendszerből.

Attól függően milyen kibocsátandó hullámhosszra van szükségünk legtöbbször Erbiumot (Er^{3+}) vagy Túliumot (Th^{3+}) érdemes használni, mivel ezeknek az f energiaszintjei sokáig képesek fennmaradni. Előbbi elem UCNP rétegszerkezetbe ágyazásával zöld (~ 550 nm), utóbbival pedig kék (~ 450 nm) fényt lehet emittáltatni.

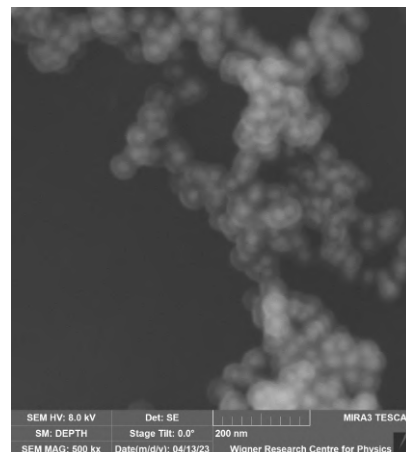
Mátrix Stabil kristályszerkezetet biztosít a beágyazódó ionok számára, melyek így megfelelő körülmények közt tudnak aktiválódni. Legtöbb esetben NaYF_4 -et (nátrium-ittrium-fluoridot) használnak mátrixként, mivel magas a kémiai stabilitása és alacsony a fotonenergiája. [6]

Bevonat Általánosan a biokompatibilitás javítása és a felszíni funkcionizálás megkönnyítése (vagy akár hatóanyag molekulák betöltése/felkötése) érdekében célszerű a ritkaföldfém mag-mátrixot egy (sok esetben nanopórusos) szilika réteggel is bevonni.

Mivel a UCNP-k alkalmazásakor legtöbbször az előbb említett okokból egy szilícium-dioxid külső bevonatra is szükség van, ezért az előkísérleteimben felhasználtam olyan részecskéket is melyeknek igaz lantanoida magja még nem volt, de felszínük SiO_2 -ből állt. Ezen részecskék felülete tehát tökéletesen modellezte az UCNP-k külső rétegének tulajdonságait, viszont alkalmazásuk költséghatékonyabb és egyszerűbben beszerezhetőek, ami a kísérletek kezdeti stádiumában igen fontos szempont volt.



(a) Sematikus rétegszerkezet



(b) Mag-héj szerkezet SEM képe

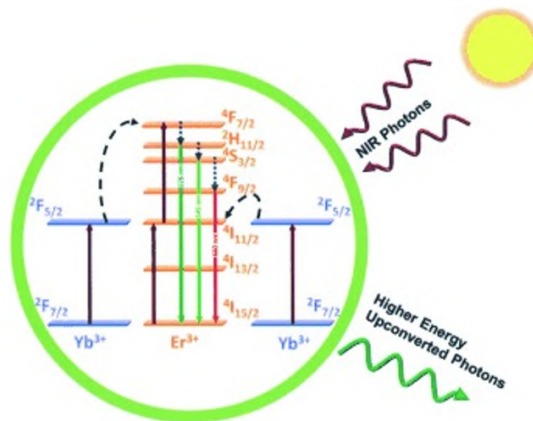
2.1. ábra UCNP-k felépítése

2.2.2. Fény felkonvertálás mechanizmusa

Az felkonvertáló nanorészecskék fluoreszcencia mechanizmusa a kétfoton vagy multifoton folyamat elvén alapul.

A rétegek bemutatásakor említettek szerint, +3-as oxidációs állapotban, bizonyos lantanoida ionok 4f elektron konfigurációval bírnak. Ezek a 4f pályák komplex struktúrájúak így több, hasonló energiájú gerjesztett állapotot tesznek lehetővé melyek jellemzően f-f átmeneteket mutatnak gerjesztést követően. A fentebb leírt NaYF_4 kristály mátrixba ágyazva a gerjesztett állapotok energiái tovább osztódnak és még több egymáshoz közeli energiaszintet hoznak létre.

Az érzékenyített és az aktivátor ion energiaátadásának működési mechanizmusa, három, egymással szorosan kapcsolódó folyamatból áll. Ezek sorban a gerjesztett állapotú abszorpció (ESA), az energiaátadási felkonverzió (ETU) és a foton lavina (PA). A mechanizmust sematikusán a 2.2-es ábra demonstrálja. [6]



2.2. ábra A felkonvertálás mechanizmusának szemléltetése [7].

2.3. Idegi jelek aktivitás vizsgálatának alapjai

2.3.1. Elektrofiziológias mérésekről röviden

Az elektrofiziológiai mérések alapja az, hogy az ideg, izom, illetve egyéb más sejtek működésük közben elektromos aktivitással rendelkeznek és az ilyenkor generált jelet (akciós potenciált) képesek vagyunk elektródokkal lemérni.

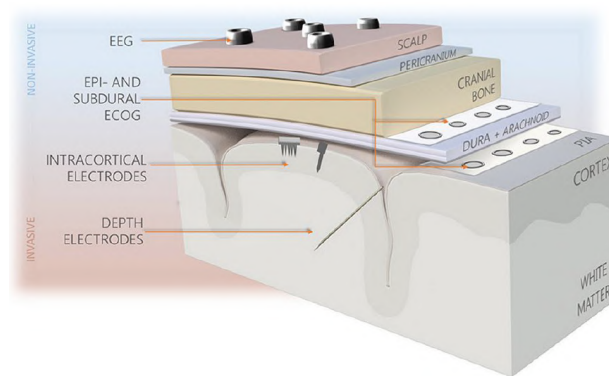
Az idegsejteket (axonjaikat) határoló membrán elektromosan polarizált, azaz a sejt belseje és külső környezete különböző töltéssel (potenciállal) rendelkezik. Aktiválódásukkor az elektromos potenciál a membrán két oldala közt megváltozik a kinyíló ioncsator-

náknak köszönhetően és az így kialakuló elektromos jel hullámszerűen végigterjedhet az idegrostokon.

Az elektrofiziológiai mérések során az elektródok a test felszínére vagy az alá, az érzékelendő területre vannak helyezve és az előbb leírt elektromos potenciálkülönbséget detektálva rögzítik az aktivitást. Az elektromos jelek feldolgozása során analógból digitálissá konvertáljuk a jelet, illetve legtöbb esetben az értelmezhetőséghez kedvéért erősítésre is szükség van, mivel az eredeti jel amplitúdója kicsi.

Az elektrofiziológiai mérések segítségével fontos információkat szerezhetünk az idegrendszer (pl. epilepsziás rohamok), az izomzat (pl. neuromuszkuláris funkciók) és a szív (pl. ritmuszavarok) működéséről.

2.3.2. Az elektródok típusai és anyaguk ismertetése



2.3. ábra Invazív és non-invazív módszerek szemléltetése [8]

Neurális aktivitás vizsgálata esetén az idegszövetbe való beavatkozás szerint kétféle elvezetés típusról beszélhetünk. Elsők a non-invazív módszerek melyek az agyi struktúráltságot nem befolyásolják, azaz a koponyán kívülre helyezünk fel elektródokat vagy nem helyezünk fel egyáltalán külső eszközt. Előbbi módszerre példa az EEG (elektroenkefalográfia) és a MEG (magnetoenkefalográfia), utóbbira pedig az fMRI (funkcionális mágneses rezonanciavizsgálat) és a CT (komputertomográfia). Ezekkel a módszerekkel egyszerűbben, (olcsóbban,) és fájdalom mentesen lehet a jelet felvenni jó időbeli felbontással, viszont, mivel a felvételt relatíve messze készítjük el a tényleges neurális aktivitástól, így sok idegsejt jele adódik össze így a térbeli felbontásunk rosszabb lesz.

Második csoportba tartoznak az invazív elektród típusok, melyekkel a központi és a perifériás idegrendszerből is egyaránt kinyerhetünk információkat. A cortex fölé (epi/-szubdurálisan is) vagy a felszín alá, illetve a gerincvelő közelébe helyezhetjük el őket. Az ECoG-ok tartoznak az első, az intracortikális és mélyagyi elektródok a második, míg a

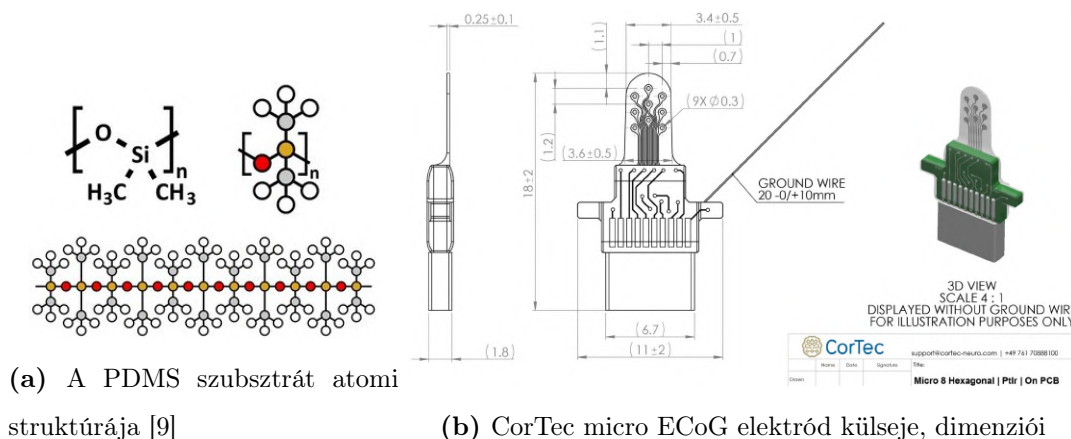
gerincvelői elektródok (Spinal electrograms/SEG) az utolsó kategóriába. Ilyen esetben az elektródok elhelyezése sokkal bonyolultabb, hiszen meg kell nyitni a koponyát/gerincoszlopot hozzá, viszont így fizikailag közelebb kerülhetünk az idegsejtekhez és az akciós potenciálok detektálása térben sokkal nagyobb felbontású lesz.

Én alapvetően az invazív módszerekkel, azon belül is az elektrokortikográfiás elektródokkal foglalkoztam a munkám során. Ezen típus szubsztrát és elvezető pontjainak tulajdonságairól lesz szó röviden a fejezet következő részében.

Flexibilis szubsztrát alapú (ECoG) elektródok

PDMS szubsztrát: Ez az anyag egy szerves polimer, amely a sziloxánok családjába tartozik, azaz szilíciumból, oxigénből és alkán csoportokból épül fel. Több szempontból is ideális tulajdonságokkal rendelkezik. Magas az elaszticitása ezáltal az agyi felszínre könnyen felhelyezhető, ráformálható, e mellett hosszú távon ellenálló is, így beültetve nehezen korrodálódik, illetve biokompatibilitása is megfelelő. Ezen felül átlátszó mivolta miatt mikroszkópos vizsgálatnál átvilágítható.

Elvezető pontok: Munkám során a CorTec-Neuro GmbH vállalat portfóliójából a Micro 8 Hexagonal Grid típusú elektróddal dolgoztam. Az eszköz 8 darab platina-irídium alapú elvezető ponttal (recording site) rendelkezik, azaz több csatornás elektródról beszélünk. Ez a Pt/Ir ötvözet kiváló elektrokémiai és mechanikai tulajdonságokkal bír. Kicsi az impedanciája, de nagy a töltésátviteli kapacitása és elektrokémiaailag igen stabil. Ezen felül irídiumtartalma nagymértékben javítja a mechanikai stabilitását, ellenáll a hajlításokkal szemben és magas a mikrostimulációs teljesítménye is.



2.4. ábra Felhasznált ECoG tulajdonságai

3. fejezet

Kísérleti eszközök és módszerek

3.1. Felhasznált nanorészecskék, vegyianyagok és eszközök

3.1.1. Az alkalmazott UCNP-k paraméterei

Abszorpciós hullámhossz (nm)	980
Emissziós hullámhossz (nm)	450
Mag	NaYF ₄ :Yb/Er
Héj	NaYF ₄
Bevonat	nem pórusos szilika (SiO ₂)
Méret (nm)	~30

3.1. táblázat A kutatócsoportom által kijelölt lantanoida alapú UCNP tulajdonságai

Ahogy az a 3.1-es táblázatból is kiolvasható, az UCNP-k érzékenyítő ionja az Itterbium, míg aktivátor ionjuk az Erbium. Ezek a ritkaföldfémek NaYF₄ mátrixba vannak ágyazva és kívülről mezopórusokkal nem rendelkező SiO₂-al vannak bevonva. A részecskék névleges átmérője 30 nm (a SEM felvételeken a későbbi fejezetekben látható, hogy ez csak az átlagos méret). Az abszorpciós hullámhosszból látszik, hogy a felkonvertáló részecskéket közeli infravörös fénnel lehet majd gerjeszteni, illetve emissziójuk ~450 nanométeres kék hullámhossz tartományt fed le. A részecskéket az *ENLIPSIMUM PTE. LTD.* portfóliójából választottuk ki és vásároltuk meg.

3.1.2. Alkalmazott reagensek, oldószerek, eszközök

- SYLGARD® 184 Poli(dimetilsziloxán) / PDMS (Sigma Aldrich)
- APTES / (3-Aminopropil)triethoxiszilán (Sigma Aldrich)
- NPTES / (3-Azidopropil)triethoxiszilán (MKH TTK)
- BCN-NHS / biciklononin-N-hidroxisukcinimid észter (Sigma Aldrich)
- TEA / Trietilamin (MKH TTK)
- Modell festék - TetKumPL-Rhod (MKH TTK)
- Agar por (Sigma Aldrich)

- EtOH / Etanol (Sigma Aldrich)
- DMSO / Dimetil-szulfoxid (Sigma Aldrich)
- PBS / Foszfát pufferelt sóoldat (Sigma Aldrich)

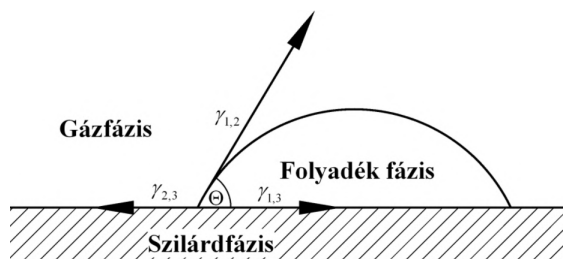
- Diener Pico nagynyomású plazma rendszer
- glove box, centrifuga, rázató (vortex), ultrahang kád
- automata pipetták, Eppendorfork, tűk, fecskendők

3.2. Mérési módszerek

3.2.1. Elektród felületen létrejött vegyületek vizsgálata

Kontaktszög: A kontaktszög (érintkezési szög) azaz θ , a szilárd anyag folyadék általi nedvesítésének mennyiségi mértéke. Geometriailag azt a szöget jelenti, amelyet egy folyadék alkot a gáz és a szilárd anyaggal való találkozásának háromfázisú határán [10].

Jelen esetben statikus érintkezési szögeket mértem, azaz a csepp (desztillált víz) a módosított felületen ült, és a háromfázisú határ nem mozdult el alatta. A statikus érintkezési szögeket a hordozó felület szabadenergiájának (azaz a szilárd anyag felületi feszültségének) meghatározására is használhatjuk. A statikus érintkezési szög a nedvesíthetőség gyors, egyszerű, mennyiségi mérését teszi lehetővé [11].

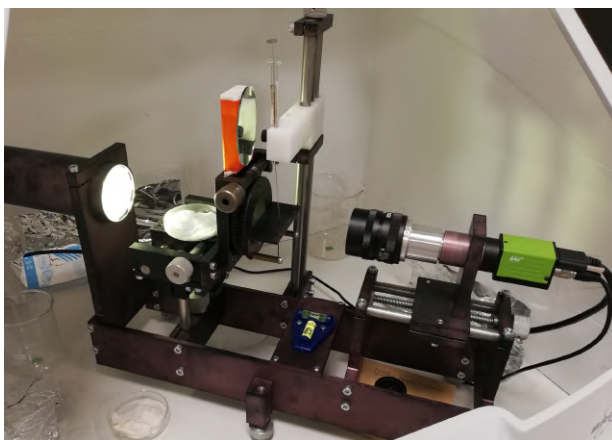


3.1. ábra Theta szög szemléltetése a három fázis találkozásának határán [12]

A PDMS felszín előkészítése során a kontaktszög hasznos kvalitatív visszajelzést ad arról, hogy a minta módosítása, hogyan befolyásolja annak hidrofilitását, azaz a vizsgált funkciós csoport feltehetően a felszínre került e.

Ahogy az korábban említettem plazmázás segítségével OH (hidroxil) csoportokat tudunk a kiválasztott modell elektród felületre juttatni, majd ezen keresztül köthetők fel az alkooszilán molekulák, a BCN-NHS és végül a módosított nanorészecskék.

A mérés során a felszínük hasonlóságból adódóan és a költséghatékonyság miatt felületkezelt PDMS modellfelületeket használtam az ECoG-ok helyett és az előbb említett három vegyület nedvesíthetőségre gyakorolt hatását vizsgáltam rajtuk.



3.2. ábra A kontaktszög mérés során használt berendezés

A mérés menete négy fő lépésre osztható, a következőképpen zajlott:

1. A vizsgálni kívánt felületet, módosított oldalával felfelé a tárgylemezre helyeztem.
2. Egy mikroliteres pontosságú Hamilton fecskendőbe desztillált vizet szívtam fel, majd felületre cseppentettem vele 1 μ l-t és a kamera szempontjából megfelelő magasságra állítottam a tárgylemezt.
3. Egy nagy teljesítményű lámpa segítségével átvilágítottam a felületen és a cseppent, majd az átellenes oldalon elhelyezkedő kamerával képet készítettem róluk.

4. Az elkészült felvételt az ImageJ szoftver, illetve annak Contact Angle plugin-jával elemeztem.

FTIR: Infravörös fénnel megvilágítva egy adott mintát, a sugárzás nagyobb részét az átengedi, míg egy kisebb részét elnyeli. Egy interferométerrel detektálva a referencia és a vizsgált anyag sugárzása által alkotott interferencia mintát egy interferogramot kapunk. Ez az interferogram a minta molekuláris „ujjlenyomatát” reprezentálja, ami alapvetően egy spektrum ahol az abszorpciós csúcsok az egyes kötésekben lévő atomok vibrációjának eredményeként jelennek meg. Több minta esetében a frekvencia függvényében ábrázolt spektrumok összehasonlításával és referenciaadatokkal történő egyeztetéssel azonosíthatók a mintákban lévő kötés mintázatok ezáltal a funkcionális csoportok.

Az FTIR spektroszkópia a hagyományos diszperziós spektroszkópiával szemben Fourier-transzformációt is alkalmaz, ami azt jelenti, hogy a rögzített spektrumot Fourier - transzformációval átalakítja az időtartományból a frekvenciatartományba, ezzel nagyobb érzékenységet és jobb spektrális felbontást eredményezve [13].

A FTIR méréseket egy Bruker TENSOR II típusú spektrométer és az ehhez kapcsolódó OPUS programcsomaggal a következőképpen végeztem:

1. A spektrométerben található MCT (mercury cadmium telluride) detektor működéséhez a rendszert folyékony nitrogén segítségével kriogenikusan lehűtöttem.
2. A gyengített teljes reflexiós (ATR/Attenuated Total Reflectance) szenzor kristály fölé helyeztem a háttérként használt mintát és a program segítségével felvettem annak spektrumát.
3. A háttérrel kicseréltem a mérendő mintára és felvettem annak spektrális ujjlenyomatát is.
4. A szoftver segítségével, ha szükség volt rá korrigáltam a spektrumokat, majd kiértékeltem a kapott eredményeket.

3.2.2. SEM

SEM képalkotás esetén, úgy készíthetjük el a felvételt az adott mintáról, hogy a felületét egy alacsony energiájú (általában 1-40 kiloelektronvoltos (keV)) elektronsugárral pásztázzuk végig raszteres mintázatban. A fénymikroszkópokkal ellentétben a felbontás ennél a technikánál nem függ a fény hullámhosszától, illetve az objektív lencse numerikus apertúrájától (összesítve a diffrakciós határtól), így akár nanométeres felbontást is biztosíthat.

A műszer vákuumban állítja elő az elsődleges elektronsugarat, amely képes a mintát letapogatni. Amikor az elektronok nekiütköznek a minta egyes pontjainak, a visszapattanó jel iránya megváltozik is ezt a változást vagyunk képesek detektálni és ezáltal a képet létrehozni [14]. A hagyományos elektronmikroszkópok esetében a mintákat vizsgálat előtt dehidratálni kell, illetve egy szén szalagra felragasztani a megfelelő töltéseloszlás miatt.

A SEM felvételek lebonyolításában a WIGNER Fizikai Kutatóközpont, Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet munkatársai voltak segítségemre. A képeket egy TESCAN MIRA 3 típusú eszközzel készítettük el.

A mintákat a vákuumkamrában való elhelyezése után 4-100-ezerszeres nagyításban vizsgáltuk (a munkatávolság és a detektortípus is változott egyes esetekben). A gyorsítási feszültséget 1-12 keV között változtattuk attól függően, hogy a szubsztrátot vagy a mérőpontokat vizsgáltuk.

EDS: Az EDS-elemzés (energiadisziperzív röntgenspektroszkópia) hatékony technika a mikro-nanométerű rendszerek kémiai anyagösszetételének vizsgálatára. SEM-el kombinálva az EDS a minta elektronsugárral történő pásztázásakor kibocsátott röntgensugárzásból nyer az összetételre vonatkozó információkat.

A SEM képalkotáskor másodlagos elektronok keletkeznek, a kölcsönhatásba lépő (pásztázott) atom ionizálódik, majd a külső héjra felugrott elektron visszatér a gerjesztés előtti alapállapotba. Az energia megmaradásának törvénye szerint ekkor egy foton emittálódik, amely kvantált állapotú és a bekövetkezett héjátmenetre jellemző. Megmérve a kibocsátott foton energiáját következtethetünk az egyes elemekre jellemző energiaátmenetre.

Elég nagy gyorsítófeszültséget ($>10\text{keV}$) alkalmazva gyakorlatilag a periódusos rendszer összes eleme detektálható. Az EDS által szolgáltatott adatokat a folyamat/minőség-ellenőrzésben, a hibaelemzésben vagy az alapkutatásban is fel lehet használni. Felismerhetők vele az egyes nemkívánatos szennyezőanyagok és e szerint módosítható a vizsgált felület előkezelésének paraméterei [15].

3.2.3. EIS

Az elektrokémiai impedancia spektroszkópiás mérések alapelve az, hogy egy adott rendszerre kapcsolt kis amplitúdójú váltakozó feszültség vagy áram (általában periodikus pl.: szinuszhullámok szuperpozíciója) megváltozásából, azaz a rendszer bemeneti jelre adott válaszából következtethetünk a rendszer működésére, felépítésére. A kis amplitúdós, perturbáló hullám, mely a rendszert kimozdítja a nyugalmi potenciáljából, ezen felül biztosítja a rendszer bemenet és kimenete közti lineáris kapcsolatot is. AC (alternating

current/váltóáram) jelet kapcsolva a rendszerre, megvizsgálhatjuk annak amplitúdó, fázis karakterisztikáját, ebből pedig modellt építhetünk, mely az egyes identifikált, klasszikus strukturális építőelemek (ellenállás, kondenzátor, induktivitás) és néhány speciális elektrokémiai építőelem (Warburg diffúziós-, konstans fázisú építőelem) kombinációjaként áll össze. Az építőelemek megkeresése után a modellre ezután matematikai modellt is illeszthetünk és a megfelelő kezdeti paraméterek ismeretében szimulálhatjuk a struktúra működését [16].

EIS mérések esetén bevett módszer egy potenciosztát által vezérelt, három elektródos elrendezés használata. A mérendő munkaelektrod (jelen esetben ezek lesznek maguk az ECoG elvezető pontjai) és az ellenelektrod (sok esetben platina szál) által alkotott áramkörre kapcsolt feszültség hatására töltésvándorlás indul el a két elektród közt, melynek mértékét egy harmadik állandó potenciálon tartott referencia elektróda (általában ez Ag/AgCl elektródot jelent) segítségével regisztrálhatjuk. Az áramerősség, azaz a mozgó töltéshordozók száma az elektródák (főként a munkaelektroda) felületétől függ, tehát az áram méréséből azok felszíni réteg strukturáltságára is következtethetünk. [17]

A mérés során kapott eredmény elemzésének egyik módszere, hogy megkeressük a vizsgált rendszer ideális áramköri elemekből (ellenállás, kapacitás) álló, helyettesítő képét, azaz modellt illesztünk. Egyszerűsége mégis legtöbb esetben megfelelő pontossága miatt a legnépszerűbb a modell Randles, melynek helyettesítő képét három fő komponens építi fel.

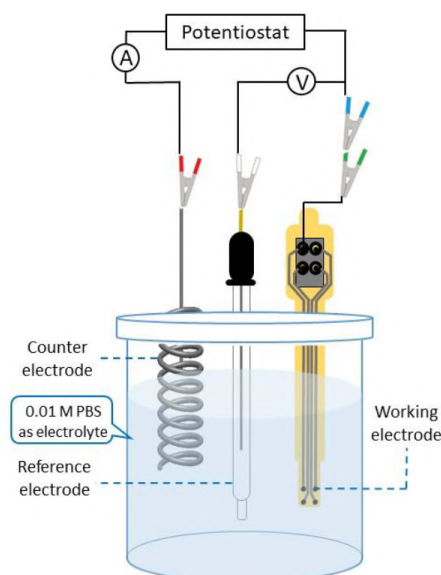
Az R_s a fiziológiai környezet (só oldat/solvent) soros ellenállását (spreading resistance) reprezentálja és az elektrolit tulajdonságai (pl.: fajlagos töltésszállító képessége, koncentrációja, hőmérséklete) illetve az elektrokémiai cella geometriai paraméterei (pl.: elektródok távolsága, felületük mérete) határozzák meg.

R_{ct} a töltésátviteli (charge transfer) ellenállás. Mikor a cellára feszültséget kapcsolunk az eredeti nyugalmi helyzetből kimozdítjuk, oxidációs-redukciós folyamatokat indítunk be, ezáltal pedig töltésátlépéseket idézünk elő az elektródfelület és az elektrolit között. Az elektrolitban található ionok bediffundálnak a fém elektród belsejébe, és a fémionok az elektrolitba kerülnek vissza. R_{ct} ezen töltés átlépést megakadályozni próbáló erőt jelenti, mely például a hőmérséklettől, az áramsűrűségtől és a cserélődő elektronok számától is függ.

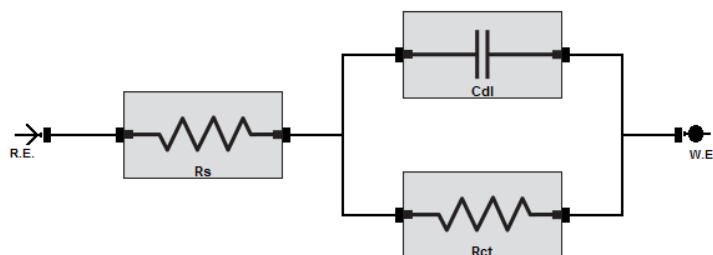
Elektrolitba merítve egy adott elektródot a két felület között, a töltés szétválasztódás miatt elektromos kettős réteg (double layer) alakul ki. Klasszikus esetben, ha csak ez a polarizáció valósul meg (azaz az előbb említett töltésátadás mechanizmus nincs) akkor a

rendszert a Gouy – Chapman modellel írhatjuk le a legjobban. A modell szerint a C_{dl} -el jelölt kettős réteg kapacitást a Helmholtz síkok által okozott kapacitás, illetve a Gouy – Chapman diffúziós réteg kapacitásának összegeként számolhatjuk. C_{dl} függ például az elektród felület méretétől, a rákapcsolt feszültségtől, a hőmérséklettől és a Helmholtz rétegek távolságától. A Randles modellben ez az elem R_{ct} -vel párhuzamosan kapcsolva jelenik meg. [18]

A modellt alacsonyabb mérőfrekvenciák esetén az úgynevezett Warburg impedanciával (W) is ki szokták egészíteni (R_{ct} -vel sorosan kötve), míg az elektródok felületének inhomogenitásából adódó hibák miatt, a még precízebb számítások kivitelezéséhez egy a konstans fázisú elemet (CPE) is szokás a kettős réteg kapacitás helyett felvenni a modellbe [19].



(a) Az EIS-mérésekhez használt három kompartmentumos elektrokémiai cella sematikus lépe. Mikro ECoG mérőpontok mint munka elektróda, Platina szál ellen elektród, Ezüst/Ezüst-Klorid (Ag/AgCL) referencia elektród, foszfát bufferelt sóoldatban [18]



(b) A mérési cella Randles féle, egyszerűsített, ekvivalens áramköri helyettesítő képe. C_{dl} -el jelölve a kettős réteg kapacitás, R_{ct} -vel a töltésátviteli (charge transfer) ellenállás, R_s pedig a fiziológiai környezet soros ellenállása.

3.3. ábra EIS mérési elrendezés és áramköri helyettesítő kép

Az EIS-mérések frekvenciatartományát az idegtudományban általánosan alkalmazott 1 és 10000 Hz közötti intervallura szokták beállítani. Ez azért praktikus így, mivel az egyes neuronok (illetve azok csoportjai) ezen a tartományon adnak mérhető jelet (tüzelnek). A lassú szinaptikus potenciálokra vonatkozó információkat tartalmazó lokális mezőpotenciál jelek 1-1000 Hz között mozognak, míg az egy és több neuron egységes aktivitást (single/multiunit activity) jellemzően magasabb, 1000 Hz és 10 kHz közötti frekvenciákon regisztrálhatjuk [18].

Az EIS mérésekhez kapcsolódóan egyelőre a modell építést és illesztést még nem valósítottam meg, csak az amplitúdó és fáziseltolás görbék egymáshoz viszonyított lefutását vizsgáltam a nanorészecskés módosítás előtt és után. A mélyebb EIS analízis során a kezdeti paraméterek megismerését követően szeretném a megfelelő Randels modellt elkészíteni és a későbbi mintasorok mérését már ennek megfelelően alakítani.

EIS mérőrendszer Az EIS elemzéseket egy Gamry Reference 600+ mérőrendszer segítségével végeztem, ami egy nagy teljesítményű, potenciosztát/galvanosztát, amelyet gyors, kisáramú mérésekre fejlesztettek ki. A Gamry használatával ECoG-ok mérőpontjainak impedanciái csak egyesével, de nagy pontossággal voltak mérhetőek. A mérőrendszer képe az alábbi 3.4-es ábrán található meg.



(a) Gamry Reference 600+ potenciosztát [20]



(b) Mérési elrendezés a Faraday kalitkán belül

3.4. ábra EIS mérési elrendezések

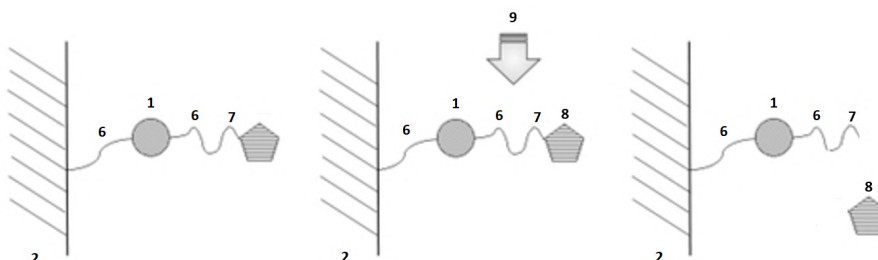
Referencia elektródként egy flexibilis csatlakozójú ezüst/ezüst-kloridból készült elektródot (Ag / AgCl, Bioanalytical Systems, Inc.), míg ellen elektródként egy platina szálát használtam. Az adatokat a Gamry Framework-ben vettem fel, míg elemzésüket a Gamry Echem Analyst 2-ben végeztem.

A munka-, referencia- és ellen elektród rendszer egy 0,01 Mol koncentrációjú PBS-ben (foszfát bufferelt sóoldat) ázott mérés közben. Ez az oldat töltötte be az elektrolit szerepét.

A mérést minden esetben egy Faraday kalitkában végeztem el. Mérések előtt etanollal lemostam az ECoG-okat ,majd ez után csatlakoztattam őket a Gamry-hez. A 3.3/a és 3.4/b ábrán is látható módon a platina szálát, az Ag/AgCl elektródot és az ECoG egy mérőpontjából kivezetett réz kábelt kellett a Gamry megfelelő színű (munkaelektrod kék+zöld, referencia elektród fehér, ellen elektród piros) csatlakozóihoz illeszteni és csak utána az elektrolitba helyezni a rendszert.

3.2.4. UV-Vis spektroszkópia

A használt modell festékeket, illetve általánosan az uncaging jelenséget, szintén egy spektroszkópiás eljárással vizsgáltam. Ebben az esetben az UV-látható tartományú fénnel való gerjesztés, majd emittálás paramétereire voltam kíváncsi.



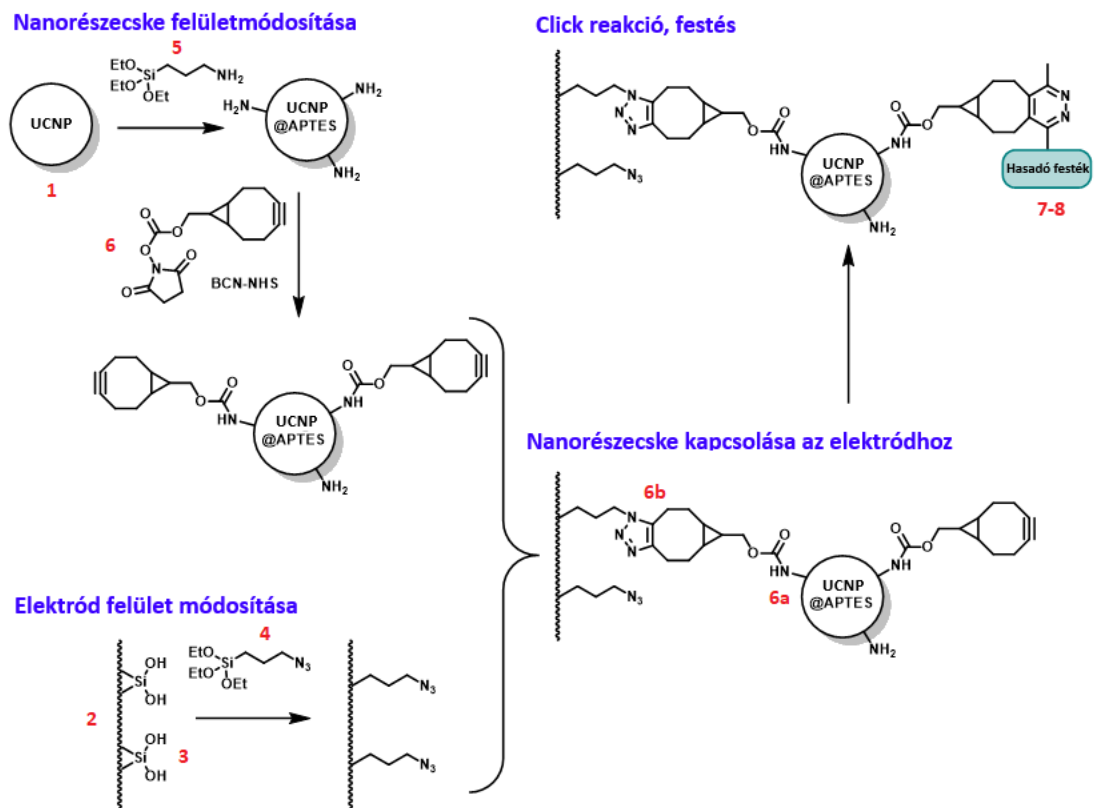
3.5. ábra A modell festék leszakadásának sematikus mechanizmusa. (1) UCNP-k, (2) elektród felszín, (6) az UCNP-eket és elektródot összekötő BCN-NHS linker vegyület, (7-8) hasadó festék TetKum és Rhodol alegysége, (9) festék hasadást előidéző, gerjesztő fotonok (a jelölések a következő alfejezet 3.6-os ábrájával korrelálnak)

A modell hatóanyag leszakadás folyamatának (ezt nevezzük uncaging jelenségnek) vizsgálatát az MKH TTK Szerves Kémiai Intézetében, Bojtár Márton tudományos munkatárs segítségével végeztem. Egy nagy teljesítményű (4 wattos), 450 nanométeres, kék fényt kibocsátó, speciális LED sort és egy Jasco FP-8300 spektrofourométert (abszorbancia), illetve egy Jasco V-750 spektrofotométert (emisszió) használtunk fel.

Az uncaging mérés menete a következő volt:

1. A TetKumPL-Rhod festett nanorészecskét tartalmazó mintaoldatot, lecentrifugáltuk és rediszpergáltuk 2ml etanolban, majd az így kapott már homogén oldatot egy üveg küvettába helyeztük át.
2. A spektrofotométerrel felvettük az oldat abszorbanca spektrumát a 200-800nm-es tartományon, illetve a spektrofluorométerrel az emissziós spektrumát is megmértük 515nm-es gerjesztéssel.
3. 30, 60 és 90 másodpercig bevilágítottuk a LED 450 nm-es kék fényével a küvettát.
4. A besugárzást követően a spektrofluorométerrel ismét 515nm-en gerjesztve, újra felvettük az emissziós spektrumot és analizáltuk a bekövetkezett változásokat.

3.3. A módosítási folyamat összefoglalása



3.6. ábra A teljes felületi módosítás lépései

A létrehozni kívánt rendszer szintézise, két egymással párhuzamosan végezhető eljárás, azaz a (modell) elektród felület és a nanorészecske módosításának megkezdésével indult. Az egyes felszíneket és fontos vegyületeket a 3.6-os ábrán piros számok jelölik.

Először a ECoG szubsztrátjának (és modellként a PDMS) felületére (2) vittem fel a kezdő réteget. Jelen esetben ez hidroxil csoportok (3) felszíni immobilizálását jelentette, amellyel a megfelelő hidrofilitást is el tudtam érni. Különböző oxigén-plazmázási paraméterek beállításával valósítottam ezt meg. A nanorészecske felszíne eleve rendelkezett ezekkel az OH csoportokkal, így annak plazmázására nem volt szükség.

A második lépést az elektród és a nanorészecske (1) esetében is egy-egy szilán vegyület felszíni polimerizálódása jelentette. A modellfelszínen azid funkciós csoporttal rendelkező NP TES (4), míg a nanorészecske esetén amin csoporttal bíró APTES-t (5) alkalmaztam.

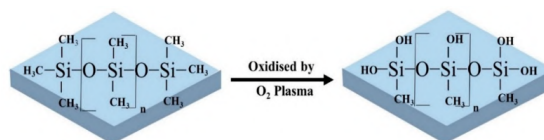
Ezen két szilán funkciós csoportot, ezáltal a modell elektródot és a nanorészecskéket, a BCN-NHS vegyület (6) tudta összekapcsolni, két eltérő funkciójú oldalláncával. BCN oldala (6b) az azid csoporttal, míg az NHS észter oldala (6a) az amin csoporttal reagált.

Az utolsó felkötésre kerülő vegyület a speciális TetKumPL-Rhod festék (7-8) volt.

Azok a BCN-NHS-ek melyek az elektróddal átellenes oldalon helyezkedtek el a nanorészecskén (azaz nem reagáltak el az elektród felület azid csoportjaival), azoknak a tetrazinnal reagálni képes felén még maradtak szabad kötőhelyek, így a BCN gyűrű hármas kötésén keresztül képesek volt kapcsolódni a festék. A festék speciális (gyűrűs) szerkezete miatt kizárólag a részecskéhez (BCN-hez) képes rögzülni, illetve csak a megfelelő hullámhosszú fénnel való gerjesztést követően tud a Rhodol alegysége leszakadni és így a megelőzően a kötés által blokkolt fluoreszcens jel sokszorosára tud emelkedni. Ez a leszakadás utáni megnövekedett foton emisszió jelesége maga az uncaging.

Plazmázás - OH csoportok kötése: Kísérletsorozatomban folyamán a felhasznált modell elektródok felszínére egy hidroxil réteget vittem, melyet oxigén plazma kezeléssel értem el. Ezt a típusú eljárást sokféle anyag felületi tulajdonságainak megváltoztatására használják. Módosítás után az OH vegyületrészlet könnyen reakcióba vihető, így megkönnyíti a további funkciós csoportokkal való összekapcsolást.

A kezeléssel tehát szilanol terminációkat (SiOH) hoztam létre a felületen (aktiváltam azt) és mindeközben a szubsztrátra került szennyeződések is el tudtam távolítani. A felület a művelet következtében ellenálló lett a hidrofób és negatív töltésű molekulák abszorpciójával szemben is. A felhasznált plazma pozitív ionokat, elektronokat, illetve semleges és gerjesztett, gáz halmazállapotú atomokat is egyaránt tartalmazott, amelyek nagy mennyiségű belső energiát hordoztak. A reakcióidő, teljesítmény és a nyomás precíz beállításával finomhangolhattam a kezelés hatásait. A plazmakezelés egy zárt, vákuumozott kamrában végeztem el. Mielőtt elektromos áram használatával gerjesztettem volna a rendszert, a levegőt ki kellett szivattyúzni, majd a gázt ezen a kialakított alacsony nyomáson hagyni beáramolni. A plazmázás hatása körülbelül 30 percig tartott, azaz ahogy telt az idő a hidroxil csoportok egyre instabilabbak lettek és könnyebben váltak le. Ebből adódóan a következő módosítást ezen időintervallumon belül végeztem el. [21]

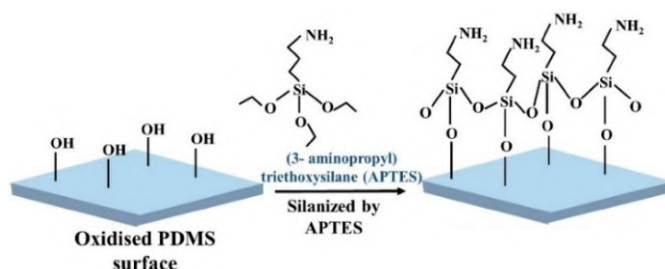


3.7. ábra OH módosított PDMS felszín [22]

Az ECoG felületek plazma kezelését egy Diener electronic Pico, alacsony nyomású plazmarendszer segítségével végeztem el. Különböző reakcióidőket és teljesítményeket is kipróbáltam, míg végül az 50s-os reakcióidő és az 50watt-os teljesítmény bizonyult ideálisnak.

Trialkoxi-szilánok: A szilán vegyületekkel való funkcionizálás fő célja az, hogy az APTES esetén amin, míg az NPOTES esetén pedig az azid csoport segítségével, más speciális biokompatibilis molekulákkal konjugálhassunk a felépülő rendszerünket.

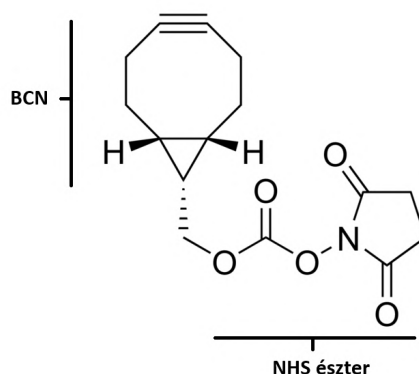
Az organikus trialkoxi-szilánok etil csoportjai, a nanorészecske, illetve az elektródok felületi OH csoportjaival, etanol kilépése mellett kondenzálódnak és stabil sziloxán (Si-O-Si) kötések tudnak kialakítani. A trialkoxi-szilánok etanolban könnyen oldódnak, így természetes pH-értékükön stabil oldatot alkotnak, ezáltal a kondenzáció is gyorsan végbemehet. A sziloxán kötésnek a létrejötte látható a 3.8-as ábrán.



3.8. ábra Elektród szubsztrát felszín szilanizációja sematikusan [22]

A trialkoxi-szilánok között önkondenzációs reakció is lejátszódhat, így gélyszerű vagy olajos oligomereket képezhetnek. A további módosítások előtt ezt a mellékterméket célszerű eltávolítani a rendszerből centrifugálási, majd rediszpergálási lépések sorozatával. Mivel az APTES/NPTES oligomerek sűrűsége sokkal alacsonyabb, mint az UCNP-ké, így ez könnyen megvalósítható volt [23].

BCN-NHS: Ezt a komplex struktúrájú vegyületet heterobifunkcionálítás jellemzi, ami azt takarja, hogy két alegységből áll össze melyek eltérő funkcióval bírnak.



3.9. ábra A BCN-NHS szerkezete [24]

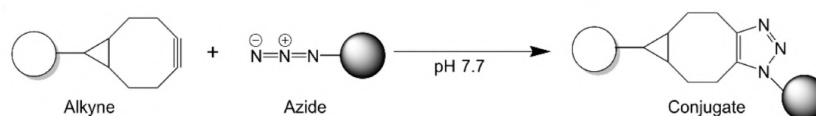
A BCN oldal segítségével játszódhat le az úgynevezett Click kémiába tartozó azid-alkin cikloaddíció, amiben az elektród felületen lévő NPOTES azid (N₃) csoportja és a

biciklononin nyolcas gyűrűjének hármas kötése hatnak kölcsön egymással, míg a vegyület másik oldalát alkotó NHS aktivált észter esetén hidrolízissel az észter és a nanorészecske primer-amin csoportja közt egy stabil amid kötés jön létre, miközben az NHS kilép.

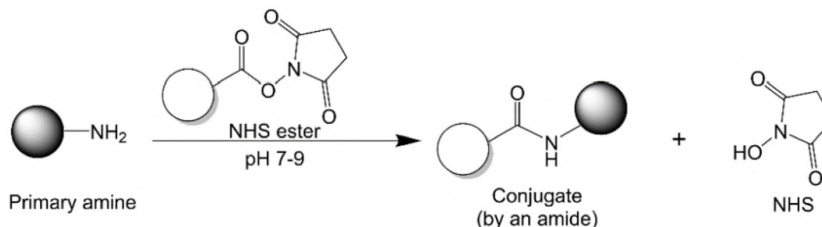
A BCN-NHS azid, amin, illetve tetrazin csoportokkal való reakcióképessége is magas, illetve a folyamat kemoszelektivitása is nagy, azaz az azidok és a BCN-csoportok nem lépnek reakcióba a biológiai mintákban található más funkciós csoportokkal, hanem csak egymáshoz kapcsolódnak nagy hatékonysággal, így biokonjugációra kifejezetten alkalmasak [25].

A vegyület két funkcionális egysége, és a rajtuk keresztül lezajló két különböző reakció segítségével voltam képes a BCN felőli résszel a modell elektród felszín azid, illetve a (következő bekezdésben részletesebben kifejtett) festék tetrazin csoportjához, míg az NHS-észter felőli résszel a nanorészecske primer amin csoportjához kapcsolódni.

Az alábbi (3.10.) ábra a vegyület két alegységének reakciómechanizmusait mutatják be.



(a) BCN oldal reakciómechanizmusa (strain-promoted azid-alkin cikloaddíció)[26]

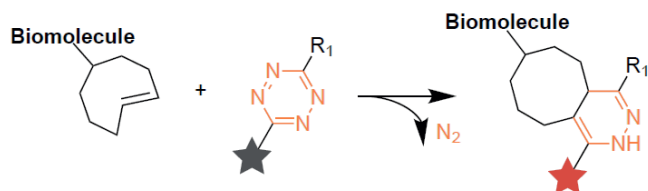


(b) NHS észter amin csoporttal való kapcsolódása [26]

3.10. ábra BCN-NHS reakciómechanizmusai

Modell hatóanyag (hasadó festék) A festék nevének rövidítése melyet használtam TetKumPL-Rhod volt. Ez kifejtve azt jelenti, hogy a festék az 1,2,4,5-tetrazin, kumarin és rhodol nevű molekulákon alapul, illetve a PL a photolabile azaz fényre hasíthatót takarja. Ez a vegyület kifejezetten az uncaging jelenség véghezviteléhez lett kifejlesztve.

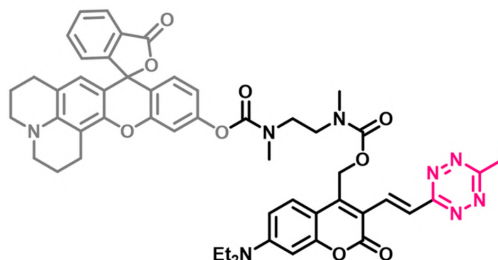
Az említett tetrazin képes a kettő vagy háromszoros kötést tartalmazó cikloalkánokkal (jelen esetben noninnal) reagálni, fiziológiai körülmények között, nitrogén gáz kilépése mellett. Ahogy az NPTES-azid interakció esetén, itt is egy Click reakció megy végbe, azzal a különbséggel, hogy itt Diels-Alder cikloaddícióról beszélünk [27].



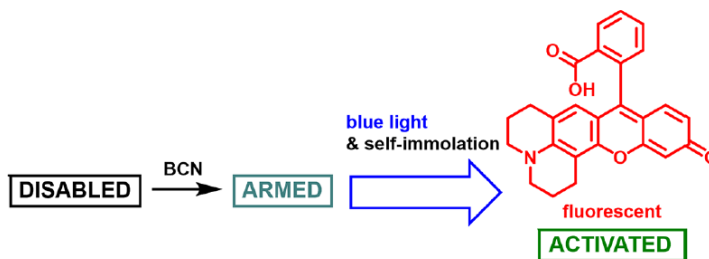
3.11. ábra Tetrazin kapcsolódása egy biomolekula ciklononin részéhez [28]

Ezen anyag használatával nem csak a teljes funkcionalizálás sikere, hanem a fény indukálta kötés bontás is tesztelhető. A festék fotolabilis linker kötése elnyeli a 450nm körüli kék fényt, így ezen a hullámhossztartományon LED besugárzást alkalmazva képes felhasadni így, a rhodol képes elválni a kumarin gyűrűtől [29]. E mellett a fluoreszcens rezonancia energiatranszfer elve szerint, a rhodol, mint donor kromofor csak akkor mutat emissziót, ha a Tet-Kum akceptor kromofor már több mint 10nm távolságra van tőle így nem csillapítja (quenching) a kibocsátott fényt [30].

Összefoglalva tehát, ha nanorészecske teljes módosítása, majd TetKumPL-Rhod festése sikerült, akkor az erős kék fény besugárzása után a kumarin és rhodol közti kötés felhasad és a felszínről lemosott oldat felülúszójában megtalálható lesz a leszakadt festék, amit centrifugálással ki lehet nyerni és fluorométerrel vizsgálni az abszorpció/emisszióját.



(a) TetKumPL-Rhod szerkezete. Rózsaszínnel jelölve a 1,2,4,5-tetrazin, feketével a vinilkumarin és a fotolabilis linker kötés, szürkével pedig a rhodol.



(b) TetKumPL-Rhod fluoreszcencia mechanizmusa. A BCN-NHS, TetKumPL-Rhod festékekkel való összekapcsolódása (armed), majd a kék fénnel történő kötés felszakítása, azaz a fluoreszcens (activated) rhodol felszabadulása.

3.12. ábra TetKumPL-Rhod tulajdonságai [29]

4. fejezet

Eredmények, értékelés

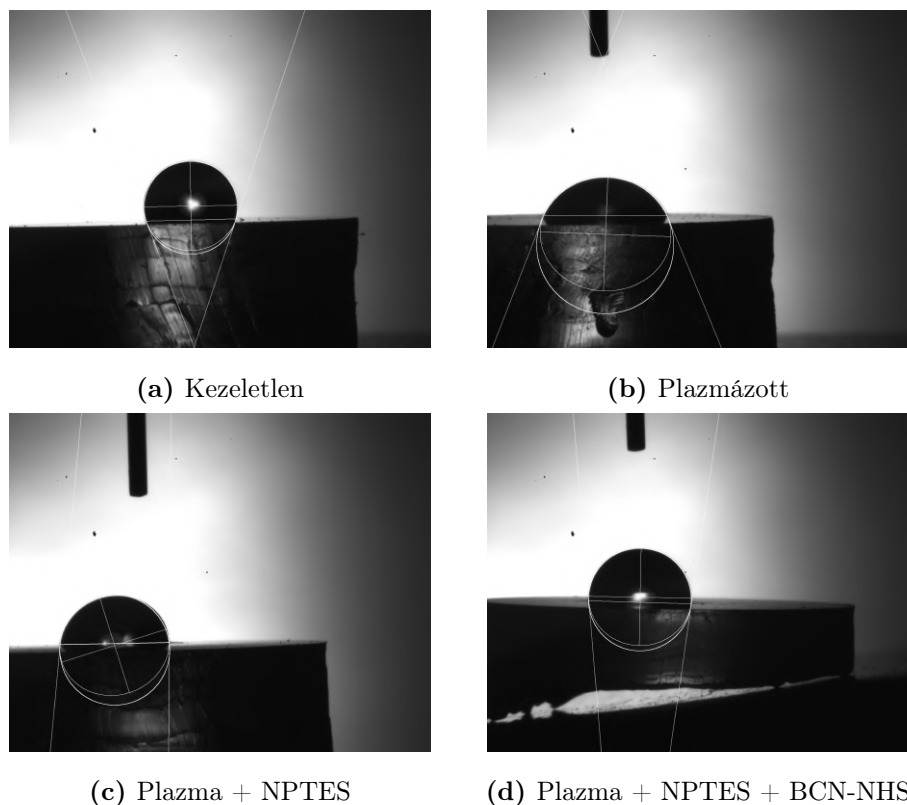
Az alábbiakban a kísérleteim közben kapott eredményeket és a velük kapcsolatban felmerülő megfigyeléseimet szeretném bemutatni. A kontaktszög, FTIR és EIS méréseket és a kapott adatok elemzését a mérőeszközök manuáljának tanulmányozása, illetve a kapcsolódó szakirodalom áttekintése után önállóan végeztem. Az UV/Vis spektroszkópiás mérés előtt TTK-s kollégáim tartottak egy demo-t a spektrofluorométer használatáról, de onnantól kezdve a méréseket/elemzést egyedül folytattam le. A SEM/EDS képalkotás esetén a berendezést konkrétan nem én kezeltem, de a vizsgált régiókat én választottam ki, illetve a képek elemzését is egyénileg vittem véghez.

4.1. Kontaktszög mérés eredményei

Mivel a szilikon ECoG-ok szubsztrátja PDMS-ből készült, így a kísérletek kezdeti szakaszában öntött PDMS-ből kivágott korongokkal dolgoztam, mivel ennek tulajdonságai vastagságától eltekintve nem tér el az ECoG-ok szubsztrátjától. A modell felületeken végzett, modifikációs lépések hidrofilitás beli változásának eredményét az alábbi (4.1) ábra sorozat szemlélteti.

Amint az jól látható az *a.)* ábrarészleten, a módosítatlan, üres PDMS felület nagy hidrofobicitással bír és a rajta ülő csepp egy hagyományos kisebb területű kör alakját veszi fel. A hozzá tartozó, ImageJ-vel leolvasott 107.4-es Theta C érték igen magasnak mondható.

Miután a PDMS felületet 50 watton, 50 másodpercig plazmáztam, a *b.)* ábrán bemutatott nedvesítettségi szintet tudtam elérni. A változás igencsak látványos szabad szemmel és szoftveres elemzéssel összekapcsolva is. A felszíni hidroxil csoportok borítottsága egészen 63.3-ig csökkentette a Theta C értéket, azaz a teljes csepp ellaposodott,



4.1. ábra Módosított PDMS felület kontaktszöge

így a "virtuális" (fehér vonallal jelölt) kör területe is megnövekedett. Az OH csoportok felvitele tehát, annak megfelelően viselkedett, mint ahogy előzetesen vártam. A nagyobb teljesítményű és hosszabb reakcióidejű plazmázás már nem váltott ki ennél nagyobb hidrofilitás belső változást, viszont több esetben is a PDMS felszínen repedéseket hozott létre. Ennek köszönhetően a további elkészített mintasorok esetén a Pico-t erre az 50 w, 50 s-os paraméterekre állítottam be.

A plazmázási lépés után az NPTES módosítás következett (*c. ábra*). Az azid vegyület képes volt reagálni a felszíni hidroxil csoportokkal. A etil csoportjai kondenzálódtak az OH-kkal, így egy homogén azid réteg tudott képződni. Igaz az NPTES is hidrofil jellegű, viszont nem annyira, mint az előző réteg OH csoportjai, tehát nagyobb kontaktszögre számítottam, mint az ezt megelőző esetben. Az NPTES borítottság létrejöttét bizonyította tehát az a tény is, hogy Theta C érték 83.0-ra emelkedett meg újra, az utóbbi alacsonyabb értékhez képest.

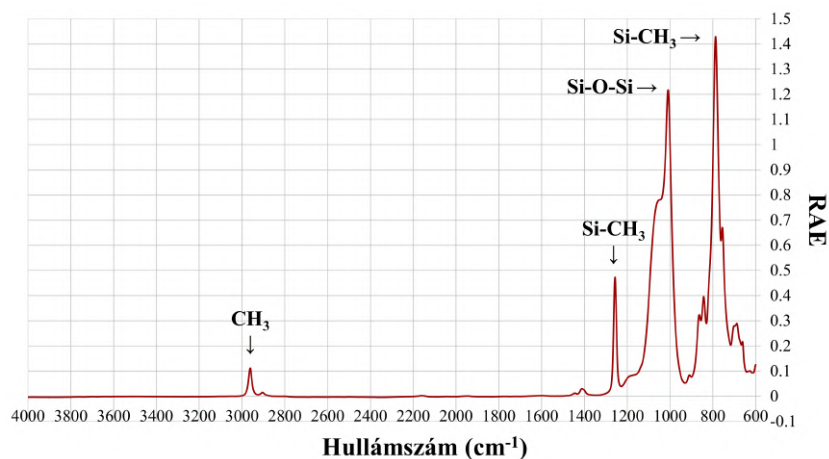
A BCN-NHS konjugálásának vizsgálata már bonyolultabb feladat volt. Az egy éjszaka át tartó (overnight) reagáltatás (saját tapasztalat és további irodalmazás alapján) kiderült, hogy valószínűleg nem lesz elegendő, ezért a felépített felületek BCN oldatba való többféle áztatási idejével is próbálkoztam (1 és 2 nap, illetve 1 és 2 hét). Elté-

rő eredményeket kaptam az egyes esetekben. A legmeghatározóbb az a minta lett, ami körülbelül 1 hétig ült az elegyben, és ezáltal 91.5-ös Theta C érékre tett szert. Ezt a *d.)* ábra képe mutatja. Két hetes reakcióidő már nem változtatta meg szignifikánsan a hidrofób karaktert, így az egy hét bizonyult optimálisnak a továbbiakban.

4.2. FTIR mérés eredményei

Ahhoz, hogy a rétegek létrejöttében még biztosabb lehessenek (ne csak indirekten a hidrofób karakterekből következtessenek rájuk) az infravörös spektroszkópiát is segítségül hívtam. A kontaktszög méréshez hasonlóan sorban megvizsgáltam, hogy a módosított felületek IR spektrumát, azaz azt, hogy az adott hullámszámokhoz tartozó relatív elnyelése (RAE/relatív abszorbanca egység), hogyan változott a használt vegyületekkel való kötések kialakítása során. A kiértékeléshez referenciaként több abszorpciós táblát is használtam [31][32], melyekben fel voltak tüntetve, hogy elvben az egyes funkciós csoportokhoz milyen intenzitásbeli csúcsok tartoznak.

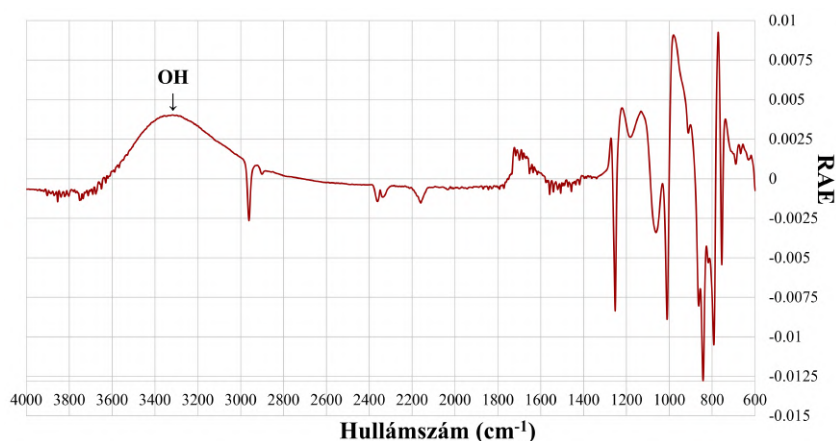
Elsőként a PDMS kiindulási spektruma lesz látható, viszont a módosítások esetén majd a háttérrelt minták mért értékei. Erre azért van szükség mivel sok esetben a spektrumbeli változás olyan kis mértékű, hogy csak így szemléltethető megfelelően.



4.2. ábra A módosítatlan PDMS IR spektruma

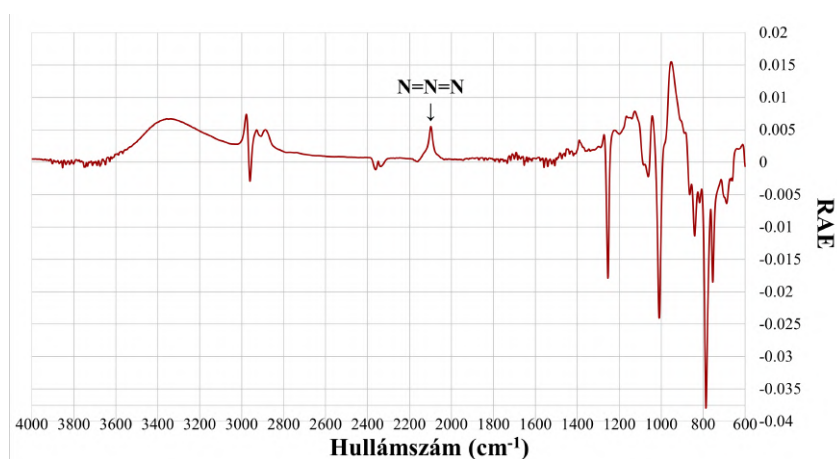
Alap esetben a PDMS metil csoportjainak C-H kötése 3000cm⁻¹-en körül adnak jelet. A szilíciumok két metil csoporttal való kapcsolódása a 800 és 1300cm⁻¹-es régiókban mérhető, míg az oxigént körbefogó két szilícium 1000-1100cm⁻¹-en okoz erőteljes abszorbanca beli növekedést (4.2-es ábra)

A hidroxil csoportok felületi borítottságát két dolog igazolja. Először is az 4.3-as ábrán, 3100-3600-as hullámszám között megjelenő relatív abszorbanca növekedése, ami



4.3. ábra Az 50 watton 50 másodpercig plazmázott PDMS (háttérrelt) IR spektruma

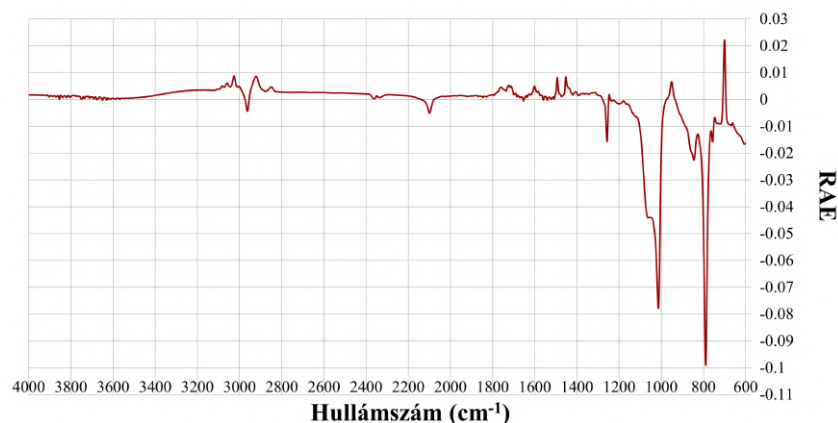
az oxigén-hidrogén kötés ismertetőjegye. Másodszor pedig a metil csoportok C-H kötésére jellemző 3000cm^{-1} -es csúcs csökkenése, illetve a szén szilíciummal való kapcsolódására jellemző 1300cm^{-1} körüli csúcs teljes eltűnése (a háttérreltség miatt 0 alá csökkenése).



4.4. ábra Plazmázott és NPTES kezelt PDMS (háttérrelt) infravörös spektruma

Miután az OH csoportokhoz képes volt kötődni az NPTES, 2100 cm^{-1} -en felfedezhetővé vált az azidra jellemző spektrumbeli változás. Az abszorbanca 0.005-re nőtt ebben az esetben (4.4. ábra).

A NPTES-re jellemző, eddig 2100 cm^{-1} -en fellelhető azid csúcs eltűnése azt jelzi, hogy az azid-alkin cikloaddíció lezajlott, tehát a BCN-NHS került a rétegeltségben legkívülre (4.5. ábra).



4.5. ábra Plazmázott, NPTES és BCN kezelt PDMS (hátterelt) infravörös spektruma

4.3. SEM képalkotás eredményei

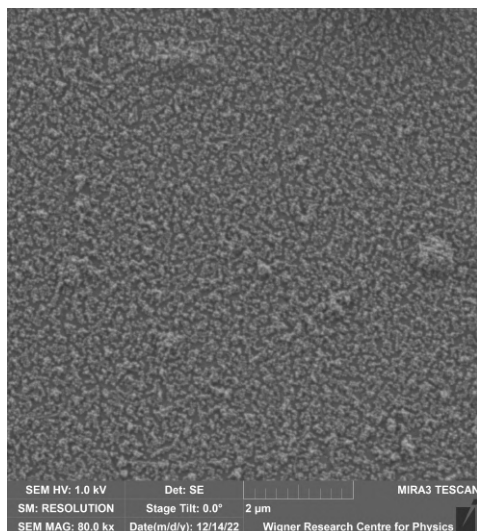
4.3.1. Agar gél teszt

Ahhoz, hogy az idegszövetbe való beültetést még in vitro szimuláljam, egy úgynevezett agar gél tesztet alkalmaztam. Ezzel az egészen egyszerű módszerrel meg tudtam állapítani, hogy a részecskék fizikai behatást követően is az egyes felszínekhez voltak e rögzülve.

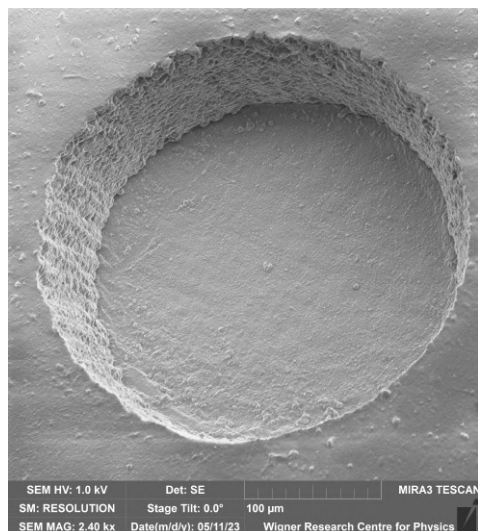
300 milligramm agar port kevertem össze 20 milliliter desztillált vízzel, majd ezt az oldatot folyamatos mágneses keverés közben forráspontig hevítettem és ezután egy két osztatú platbe öntöttem. A lehűlt, megszilárdult agar gél tömörsége hasonló lett az idegszövetéhez.

Csipesszel megfogtam majd ráhelyeztem az UCNP-vel funkcionáliszt szilikon ECoG-okat és enyhén, csak kézi erőt alkalmazva, többször rányomtam az agarra. Ezután etanollal lemostam az esetlegesen leszakadt nanorészecskéket, illetve a maradék agar gélét és nitrogén gázos szárítást követően vittem őket a mikroszkópos vizsgálatra.

A 4.6-os ábrán egy-egy ilyen tesztelt ECoG szubsztrátjának közeli és mérőpontjának távoli SEM felvétele látható.



(a) ECoG szubsztrát felszíne



(b) ECoG egyik mérőpontjának felszíne

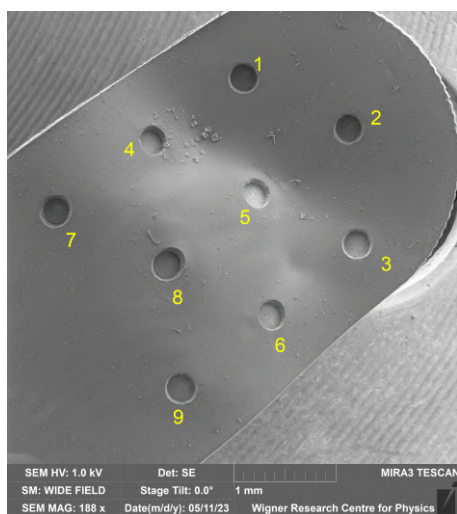
4.6. ábra Agar gél teszt SEM felvételei

4.3.2. Részecske borítottság vizsgálata

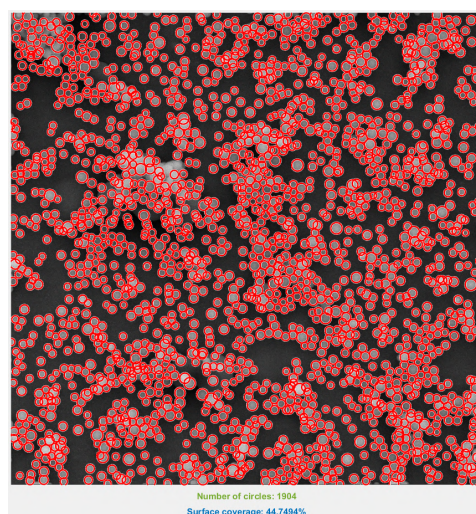
Ahhoz, hogy sikeresnek mondhassam a funkcionalizálást, a SEM felvételeken képelemzést is végeztem.

Az elemzéshez a Matlab R2023a és azon belül is az imfindcircles függvényt találtam a legpontosabbnak. Ezt a cirkuláris Hough transzformáció alapú eljárást kifejezetten kör alakú objektumok detektálására fejlesztették ki.

Az ECoG elektródok több, a mérőpontok közelében lévő szubsztrát régiójáról (kon- zisztensen minden esetben 1-9-ig jelölve) is készítettem SEM felvételt.



(a) Vizsgált régiók



(b) A 4-es régióban detektált részecskék

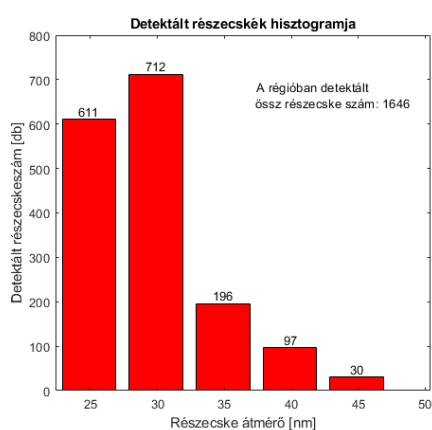
4.7. ábra UCNP-vel funkcionalizált szilikongumi ECoG SEM képei

Az előbb említett régiókon elvégeztem a képelemzést is. A következő táblázat ezen régiók számolt paramétereit tartalmazza.

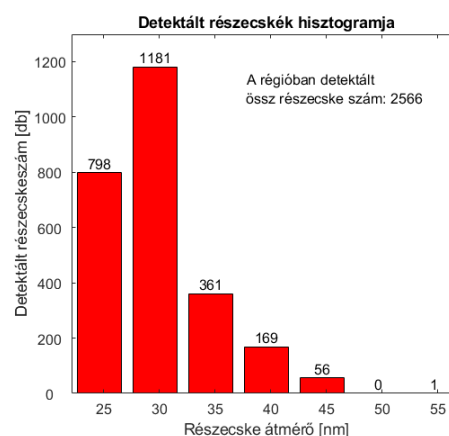
Régió	Borítottság (%)	Részecske szám (db)
1	39,78	1646
2	46,67	1899
3	63,39	2566
4	44,75	1904
5	41,72	1781
6	43,33	1832
7	42,50	1810
8	51,69	2126
9	45,13	1977

4.1. táblázat UCNP funkcionális minta, SEM képeinek, Matlabbal elemzett eredményei

Matlab segítségével ezután kiszámoltam részecskék méretét is, majd ezt ábrázoltam hisztogramként. Az előző 4.1-es táblázatban látható, hogy az **1**-es régióban volt a legkevesebb, míg a **3**-as régióban a legnagyobb a részecskék száma, így ezt a két szélsőértéket jeleníttem meg az alábbiakban.



(a) Az **1**-es régió hisztogramja



(b) A **3**-as régió hisztogramja

4.8. ábra Két kiválasztott régió részecske számának hisztogramja

Szabad szemmel, a SEM képeken is jól látható, de a Matlab-os elemzés után kifejezetten elmondható, hogy sikerült UCNP-kkel sűrűn fedett, közel 50%-os borítottságot elérni a szubsztrát, site-ok közeli régióiban. Szembetűnő ezen kívül az is, hogy a megvásárolt

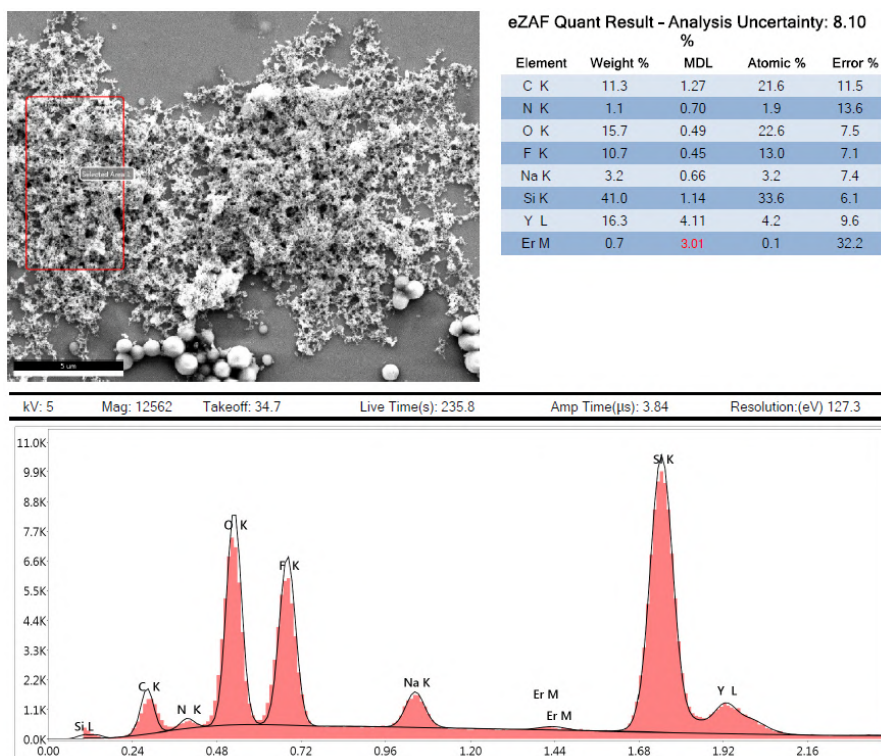
UCNP-k átlag (névleges) mérete az optimális 30 nm-es tartományban van. Ezen kívül az ECoG-UCNP rendszernek sikerült átmennie az agar gél teszten, tehát a fizikai behatásra sem szkadtak le a részecskék a szubsztrát felületről.

4.3.3. EDS-el kiegészített SEM

Az EDS segítségével a SEM-en érdekesnek talált egyes területeket elemeztem ki anyagösszetétel szerint, a szennyeződések kiszűrése végett. Alább egy, az elektród szubsztrátra kötött, aggregálódott UCNP multiréteg (csomó) látható.

A százalékos összetétel (atomic%) jól mutatja az UCNP rétegeket felépítő atomok meglétét. A NaYF_4 mátrix elemei arányosan jelennek meg (a Nátrium és Ittrium 3-4, míg a Fluor 13 atomszázalékkal) és igaz nagy hiba valószínűséggel (error%), de feltűnik az aktivátor ionként funkcionalizáló Erbium is (az Itterbium érzékenyített ion ezen az alacsonyabb, 5 keV-os pásztázási feszültségen még nem jelent meg).

Ezen felül a vizsgált mintasor atom%-ából és a SEM képből is jól kivehető, hogy a felszínt szén alapú mikromolekulák szennyezték be, amiket szigorúbb tisztítási lépésekkel a jövőben eliminálni kell majd.



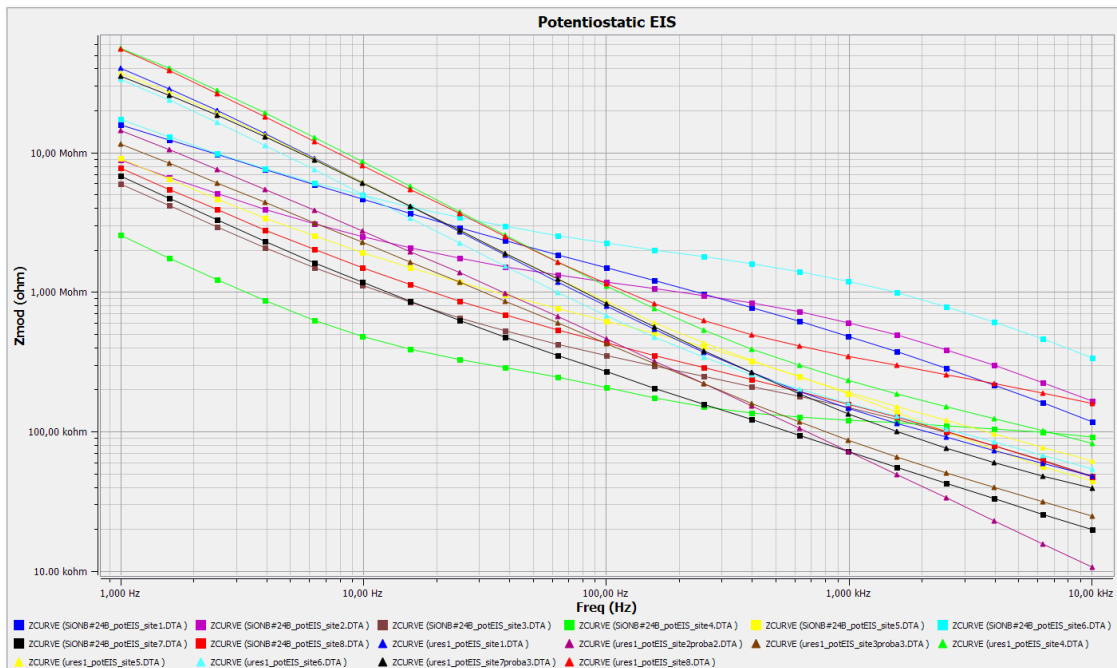
4.9. ábra UCNP (és szennyezőanyaggal) borított terület EDS vizsgálatának eredménye

4.4. EIS eredmények

A reakciómechanizmusok sora melyet alkalmazok az elektródfelületek kezelése során, elvben a részecskék PDMS szubsztráthoz való kötődését teszik csak lehetővé, azaz a Pt/Ir mérőpontokhoz nem szabadna csatlakozniuk. Ezt a feltevést, illetve egyéb szennyezőanyagok site-okon való megtapadását szerettem volna alapvetően az EIS módszer segítségével vizsgálni, tehát a nemkívánatos rétegek meglétét detektálni és kiszűrni.

A Módszerek fejezetben leírtak szerint az EIS mérések folyamán az elektród rendszer kis amplitúdójú gerjesztésére adott impedancia válaszjelekre voltam kíváncsi az ECoG-ok egyes mérőpontjain. Azt próbáltam meg összehasonlítani, hogy a nanorészecskés felületkezelés milyen hatással van a rendszer főként amplitúdó és részben fáziseltolási karakterisztikájára.

4 módosítatlan ("ures1-4") és 4 nanorészecskével módosított (SiONB#23-24/A,B) ECoG impdenaciáit vizsgáltam a 1-10000 Hz-es frekvencia tartományon, 25 mV-os AC feszültség mellett, 5 pont/dekádos felbontással. A teljes frekvencia tartományban kíváncsi voltam az impedancia görbék lefutására, illetve irodalom kutatásom közben több olyan cikket találtam ([33], [34]) ahol hasonló ECoG struktúrákat vizsgáltak kifejezett 100 és 1000 Hz-en, így ezt a két régiót én is részletesebben figyeltem meg.

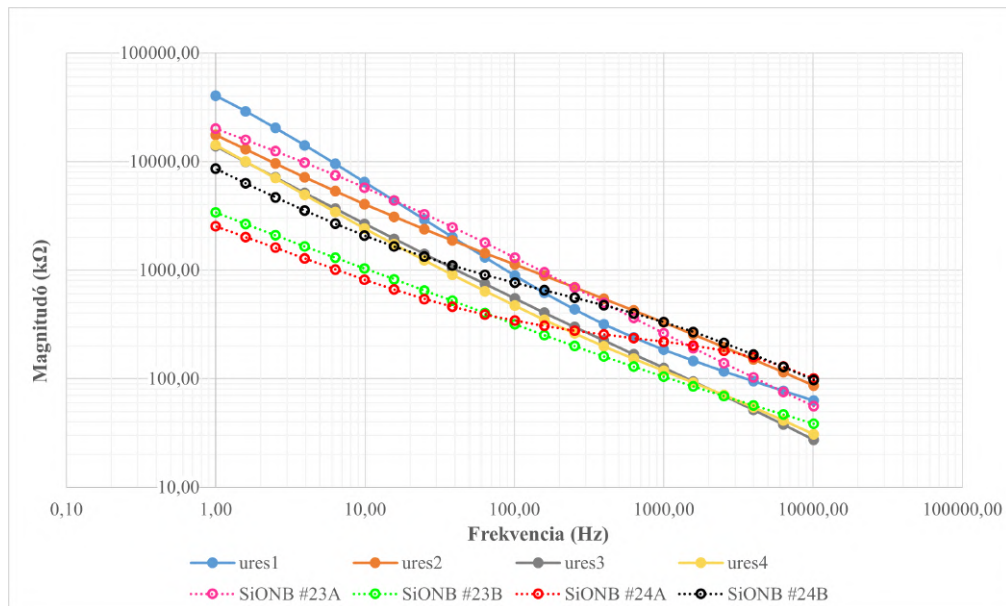


4.10. ábra Nanorészecskékkel módosított (SiONB#24B), illetve felület kezelés nélküli (ures1) ECoG-ok magnitúdó karakterisztikája.

A 4.10-es ábrán 1-1 módosítatlan (háromszög jelölő) és módosított (négyzet jelölő)

ECoG mérőpontjainak frekvencia-magnitúdó görbéi láthatók. A site-ok párban azonos színnel jelennek meg a két esetben. A Gamry-hez tartozó analízáló szoftverrel ekkora (20 körüli) site szám mellett is alapvetően csak 2 elektródot tudtam átláthatóan kezelni, így azt a két elektródot választottam ki (ures1 és SiONB#24B) melyek karakterisztikája legjobban reprezentálni tudják a maradék 3-3-ét is. Ahogyan azt a grafikon is jól mutatja a nagy frekvenciás tartományon, 10 kHz körül a módosított elektródok magnitúdóinak átlaga a módosítatlanok felett található. Előbbi esetben 96,98 k Ω , míg utóbbiban 62,74 k Ω -ot mértem, tehát az emelkedés közel 35%-os. Ahogyan csökkentettem a perturbáló, gerjesztő szinusz hullám frekvenciáját úgy került egymáshoz egyre közelebb a két rendszerhez tartozó impedancia vektor hossza. 1000 Hz-en már csak %22 volt a különbség, míg 100 Hz-en a két görbe (közel) metszette egymást, így ebben a pontban gyakorlatilag megegyezett a két (617,51 és 651,14 k Ω) átlag érték. Ettől a ponttól kezdve a két görbe pozíciója megváltozott és a módosítatlan ECoG impedanciák kezdtek el dominálni. A változás olyan mértékű, hogy 10 Hz-nél már 300% volt a különbség, ami 1 Hz-en egészen a 470%-os maximumig emelkedett a módosítatlanok javára.

Nem kiemelve 1-1 elektród site-jait egyesével, hanem megvizsgálva egyszerre mind a 4-4 elektród site-jainak átlagát, az előzőhöz hasonló trend alakult ki. Magas frekvencián a módosított, míg alacsony frekvencián a módosítatlan elektródok impedanciái domináltak.



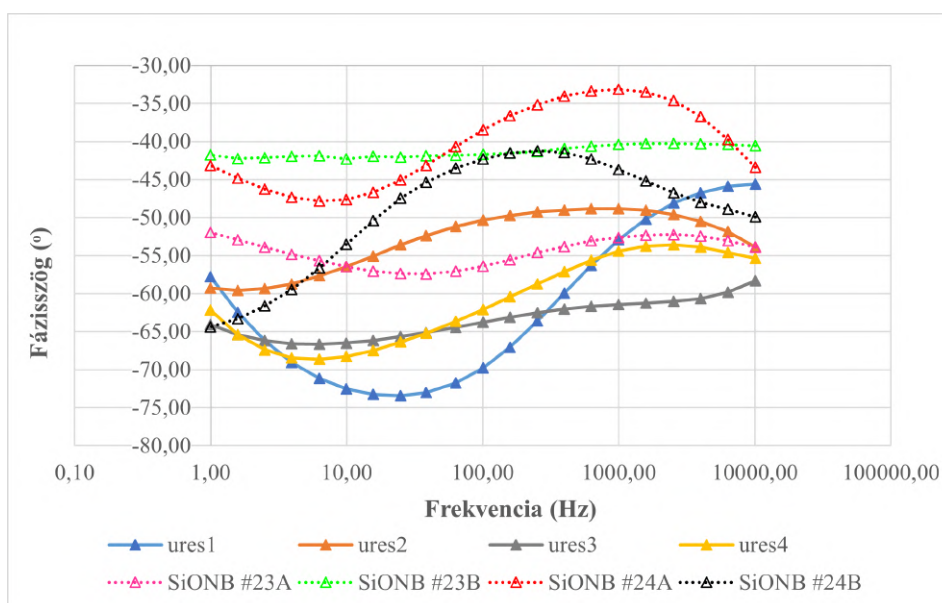
4.11. ábra Felület kezelés nélküli és nanorészecskékkel módosított ECoG-ok magnitúdó átlagainak karakterisztikája.

Frekvencia (Hz)	Kezeletlen ECoG (k Ω)	NP módosított ECoG k Ω	Eltérés (%)
10078,13	51,74	72,76	29
2527,57	113,16	150,48	25
998,26	189,53	229,24	17
252,40	422,41	429,82	7
100,45	757,41	681,23	-5
24,93	1982,80	1447,39	-37
9,93	3894,80	2419,19	-61
2,50	11038,08	5200,72	-112
1,00	21505,10	8633,52	-149

4.2. táblázat Kezeletlen és kezelt ECoG magnitúdóinak összehasonlítása

Konklúzióként elmondható, hogy igaz egyes frekvenciákon változott a karakterisztika a módosítás hatására, viszont az irodalmi adatok ([33], [34]) alapján, kifejezetten 100 és 1000 Hz-en sem haladta meg az 1, illetve 0,5 M Ω -os magnitúdót. A módosítás hatására tehát nem változik meg annyira a rendszer ellenállása, hogy ne lehessen vele majd később, elektrofiziológiai méréseket végezni.

Ezután megpróbálkoztam a fázis karakterisztika tanulmányozásával is. Sajnos ebben az estében nem tudtam az előző vizsgálathoz hasonló, egyértelműnek tűnő következtetéseket levonni.



4.12. ábra Fázisszögek átlagának karakterisztikája

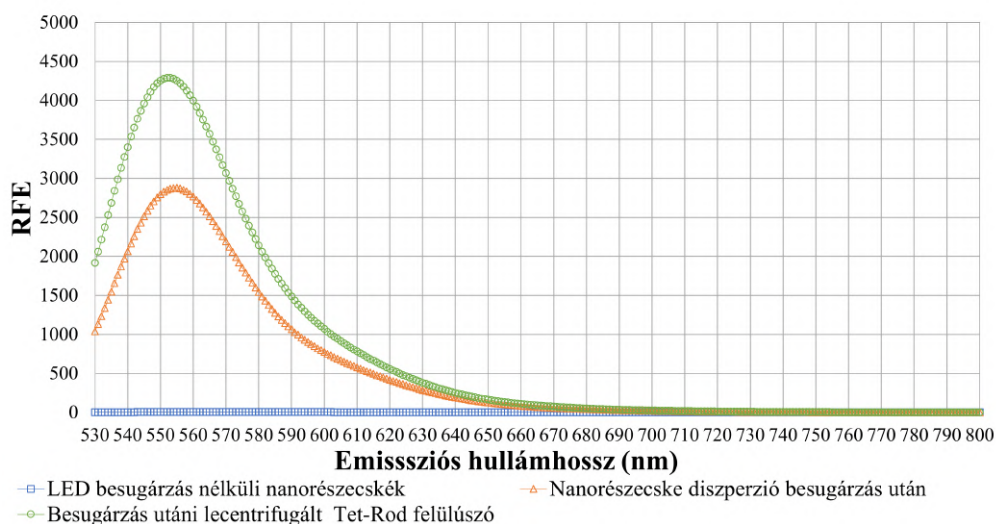
Amint az a 4.12 ábrán is látszik, egyik ECoG típus esetén sem kaptam kifejezetten konztisztens eredményeket. Több görbe egy elfordított S alakot mutat, ez kifejezetten az ures1 és a SiONB#24A ECoG esetén szembetűnő. Ures1 esetén a görbe minimuma $-73,43^{\circ}$ -on 25 Hz körül látható, majd egy átmeneti növekvő tartomány következik, míg végül egy plató szakasz található $-45,63^{\circ}$ -os fázisszöggel, 10 kHz en. Van 1-1 szinte teljesen ellaposodott görbe is (ures3, SiONB#23B) melyek fázisa szinte közel konstans marad (főleg SiONB#23B-nél) azaz a fázistolás frekvencia függetlennek adótt. Ami összességében megfigyelhető az az, hogy a módosítás hatására szinte minden esetben az adott frekvenciához tartozó fázistolás csökkent, azaz a görbék feljebb tolódtak.

Az fázisszögek ilyen szintű ingadozása több kérdést is felvet maga után, melyek közül az egyik legfontosabb a cella geometriájának fontossága. A gerjesztő és mért áram közti ekkora fáziskésés különbség (akár egy adott elektródon belüli site-okon is) arra utalhat, hogy mérés közben az elektródok nem helyezkedtek el egymáshoz képest megfelelő távolságban/irányban. Egy későbbi mérés folyamán törekedni kell majd rá, hogy a munka és a referencia elektród minél közelebb kerüljenek egymáshoz és úgy legyen kiegyenesítve a flexibilis szubsztrát, hogy ne árnyékolják egymást a site-ok.

A probléma egy másik forrása az elektrolit oxigén tartalma lehet. Az elektród felületen lezajló oxidáció-redukciós folyamatot könnyen befolyásolhatja, a PBS-be mérés közben a légkörből beoldódó O_2 szint. Ezt elkerülendő, az oldatba N_2 buborékoltatást szeretnék majd alkalmazni.

4.5. UV/Vis spektroszkópia - hatóanyag leadás eredményei

Az UV-Vis spektroszkópiás mérés folyamatán azt a tényt akartam bebizonyítani, hogy a TetKumPL-Rhod fotolabilis régióval rendelkező festék megfelelően rögzült-e a módosítási folyamat hatására a nanorészecskék felszínén (csak az előztessen rögzült állapotba került, BCN kötött festék tud hasadni, oldott, szabad festék nem), viszont a rendszert besugározva a megfelelő hullámhosszú fénnel képes lesz e mégis lehasadni róla. Egyelőre még nem az UCNP-k lézeres gerjesztés utáni felkonverziójakor keletkező fotonok hasították a modell hatóanyagot, hanem direktbe a labilis régió elnyelési tartományában kibocsátó LED fényforrást használtam a kötés bontására, illetve ebben a kísérletben a részecske-festék rendszer még csak oldat formában volt jelen, nem pedig az ECoG-okra kötve.



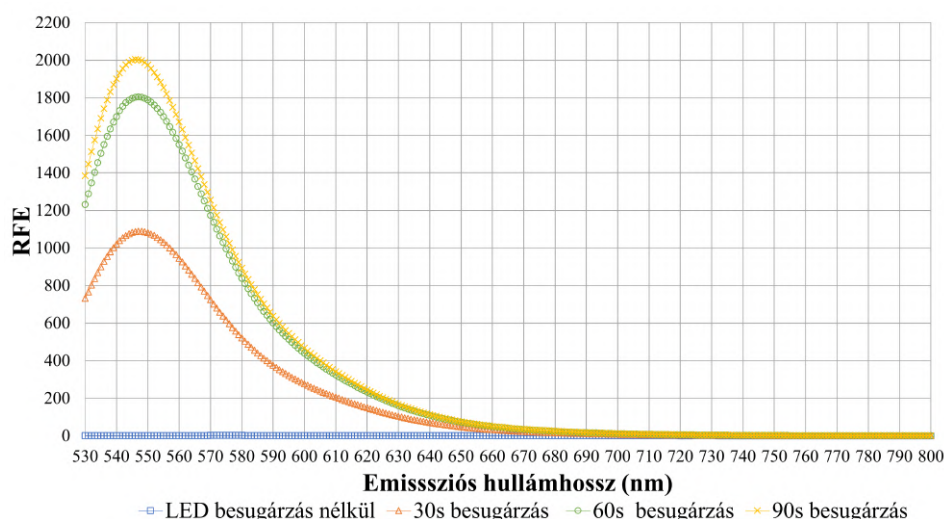
4.13. ábra Etanolban rediszpergált, TetKumPL-Rhod festett UCNP rendszer emissziós spektruma

A LED kék fényével történő besugárzás nélkül a TetKumPL-Rhod funkcionizált, lecentrifugált, majd etanolban rediszpergált nanorészecskék fluoreszcenciája közel elhanyagolható volt. Maximum emissziós intenzitása 5.86 relatív fluoreszcencia egységig (RFE) emelkedett csak meg, mely a többi, ennél szignifikánsan magasabb értékhez viszonyítva nem is látszik a 4.13-as ábra görbében.

A BCN-el való reakció, majd az erős kék fénnel való aktiváció a fotolabilis linker kötés hasadását eredményezte. 545 nanométeren közel ezerszeres relatív fluoreszcencia intenzitásbeli növekedést figyeltem meg a rhodolhoz tartozó 515nm-es gerjesztése mellett, mindezt összesen 30 másodperces LED besugárzás után. Emellett az is kiderült,

hogy a LED besugárzás és a fluorométeres mérés közt eltelt idő is befolyásolja a labilis linker kötések szakadásának mértékét, mégpedig promótálja azt. Mindez a festékben található speciális linker kötések önfeláldozó (self-immolation) mechanizmusának köszönhető, amely csak bizonyos idő elteltével mutat 100%-os hatékonyságot [29].

Vizsgáltam ezután azt is, hogy a besugárzás hossza, hogyan befolyásolja az uncaging mértékét. Ahogyan azt a 4.14-es ábra is szemlélteti, minél több időt töltött az oldatot tartalmazó küvetta a LED fény alatt (30, 60 és 90 másodperc) annál több nanorészecskén lévő fotolabilis kötés szakadt fel, így az emisszióban egyre nagyobb növekedést tapasztaltam. Időben az értékek növekedése egy standard telítődési görbe paramétereit követik. Ebben a mérésben a festett részecskéket etanol helyett PBS-ben diszpergáltuk újra még a besugárzás előtt, így sikerült azt is kideríteni, hogy ebben az alkalmazásban az EtOH optimálisabbnak bizonyul mivel akár kétszeres RFE emelkedést is el lehetett érni ezen oldószer használatával.



4.14. ábra PBS-ben diszpergált, TetKumPL-Rhod festett rendszer emissziós spektruma, növekvő idejű LED besugárzás mellett

A mérések alapján elmondható tehát, hogy a fotolabilis festék egyrészt képes volt az UCNP-k felületére kötni (csak oda), illetve a beérkező 515 nm-es hullámhosszú fotonok hatására, speciális gyűrűszerkezetéből adódóan, a hasadást követően szignifikáns növekedést tapasztalhattam a fluoreszcens emissziójában is. Ráadásul az emissziós folyamat esetén megállapítható, hogy a self-immolation mechanizmusnak köszönhetően minél többet vártam a gerjesztés és a fluorométeres mérés közt, illetve minél hosszabb idejű volt maga a LED besugárzás, annál nagyobb volt az Rhodol által emittált fotonok száma is.

5. fejezet

Összefoglalás

TDK dolgozatomban a BSc-n elkezdett (és szakdolgozatként közölt), illetve MSc folytattott (és Önálló laboratórium I.-en bemutatott) kutatásomban mélyültem el mégjobban. A Magyar Kutatási Hálózat Természettudományi Kutatóközpont egy olyan projektjén volt lehetőségem dolgozni, melyben lantanoida maggal rendelkező, felkonvertáló nanorészecskéket kötöttem különböző idegszöveti beültetésre alkalmas elektród felszínekre, úgy, hogy a részecskék speciális tulajdonságait kihasználva orvosi biológiailag alkalmazni is tudjuk őket, ezzel kiegészítve az eredeti elektrofiziológiai mérésekre irányuló funkciójukat.

Munkám során elmélyültem a mikrotechnológiai felületkezelések lehetőségeiben. Többféle mikroszkópia típussal ismerkedtem meg elméletben és gyakorlatban is egyaránt és ezeket a mérőeszközöket a kifejlesztett rendszerem validációjára is felhasználtam. Többek közt elsajátítottam a Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia használatát ezáltal nyomonkövethettem a felépülő rendszerem bizonyos részfolyamatait, pásztázó elektronmikroszkóppal készített felvételeken végeztem képfeldolgozást és az elektródokon elhelyezkedő mérőpontokat mint áramkörü elemeket vizsgáltam az elektrokémiai impedancia spektroszkópia segítségével.

A kontaktszög és FTIR mérések segítségével láthatóvá tudtam tenni, hogy az elektród felszín plazma kezelése, szilanizációja azid módosítása és a BCN-NHS linkerrel való funkcionálizálása a hidrofobicitások és az infravörös spektrum csúcsai alapján sikeres volt. Miután a részecskék felszínét is módosítottam és összekapcsoltam őket az elektród felülettel a BCN-NHS-en keresztül, SEM képalkotás segítségével tudtam bizonyítani, hogy a részecskék ténylegesen rögzültek a felszínre és mechanikai behatás (Agar gél tesztelés) után sem szakadtak le onnan. Ezután egy elektrokémiai cellába munkaelektrodként bekapcsolva az ECoG-om pt/ir mérőpontjait, vizsgálni tudtam az azokra esetlegesen a módosítási folyamat során lerakódott szennyeződés és hibásan megtapadt nanorészecskék

hatását. Megállapítottam, hogy az impedancia magnitúdók átlaga a módosított rendszerekben alacsony frekvencián csökkent, míg magas frekvencián nőtt a funkcionalizálatlan elektródokhoz képest, viszont (irodalmi adatok alapján) egyik tartományban sem volt olyan szignifikáns a változás, hogy ne lehetne majd megkísérelni elektrofiziológias méréseket az eszközökkel. Viszont a fázisszögek vizsgálatából kiderült, hogy a cella geometria és az elektrolit oldat összetételén még mindenképp változtatni kell, hogy a későbbi in vivo mérés előtt még az eredményeimet teljesen hitelesíteni tudjam. Ezeken a méréseken felül még LED fénnel való gerjesztést követően UV/Vis spektroszkópiával megfigyeltem azt is, hogyan hasad le a festék fluoreszcens alegysége az UCNP-kről és ezáltal, hogyan emelkedik meg a foton emissziója.

Jövőbeli terveim közé tartozik, hogy az előbb említett EIS mérési elrendezést tökéletesítsem, illetve az elektród-UCNP-festék rendszer hatóanyag leadó képességét in vitro körülmények között, a részecskék NIR lézeres gerjesztést követően, (patkány) agyszeleteken teszteljem, illetve ha ez sikeresnek volt mondható in vivo is, élő állat idegszövetébe ültetve végezzek kísérletet a leszakad festékrészlet nyomonkövetésével kapcsolatban. Projektem végső célja pedig az, hogy a festéket egy szintén a részecskék felszínéről lehasítható neurális hatást kiváltó vegyületre cseréljem le és azzal befolyásoljam lokálisan az idegrendszer aktivitását, miközben ezt a változást szimultán, az elektród mérőpontjain keresztül nyomon is kövessem.

A nanorészecske funkcionalizáláshoz kidolgozott, jelen dolgozatban is ismertetett recept részét képezi a "Diagnosztikai méréshez alkalmazható mikrofluidikai folyadékcella és eljárás alkalmazására" című beadás alatt lévő szabadalomnak is, melyben 50 százalékos feltalálói részesedéssel rendelkezem.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni **Dr. Fekete Zoltán** általános iránymutatását és szakmai támogatását a projekt folyamán.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Zátanyi Anitának** és **Csernyus Bencének** a téma mélyebb megértésében és a mérések megvalósításában nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Dr. Péter Lászlónak** a Wigner Fizikai Kutatóközpont Szilárdtestfizikai és Optikai Intézetből, hogy segített elkészíteni a pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket, illetve, hogy az elektrokémiai mérésekhez szakmai segítséget nyújtott.

Köszönet illeti ezen kívül **Dr. Kele Pétert**, **Bojtár Mártont** és a Magyar Kutatási Hálózat Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet, Kémiai Biológiai Kutatócsoportját az NPTEs és a modell festék előzetes elkészítéséért és a projekt inicializálásában való segítségnyújtásért.

Hálás vagyok belső konzulensemnek **Dr. Szlávecz Ákosnak** az adminisztrációban nyújtott segítségét.

Ezekon felül köszönettel tartozom a Magyar Kutatási Hálózat, Energiatudományi Kutatóközpont, Mikrorendszerek Laboratóriumának, hogy használhattam az erőforrásaikat.

Irodalom

- [1] M. Vert, Y. Doi, K.-h. Hellwich és tsai., „Terminology for Biorelated Polymers and Applications (IUPAC Recommendations 2012)“, *Chemistry International – Newsmagazine for IUPAC*, 34. évf., 3. sz., 377–410. old., 2014, ISSN: 0193-6484. DOI: 10.1515/ci.2012.34.3.25.
- [2] M. Gu, X. Wang, T. B. Toh és E. K. H. Chow, „Applications of stimuli-responsive nanoscale drug delivery systems in translational research“, *Drug Discovery Today*, 23. évf., 5. sz., 1043–1052. old., 2018, ISSN: 18785832. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.11.009. cím: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.009>.
- [3] F. Guerra, M. Attia, D. Whitehead és F. Alexis, „Nanotechnology for environmental remediation: Materials and applications“, *Molecules*, 23. évf., 7. sz., 1760. old., 2018. DOI: 10.3390/molecules23071760.
- [4] N. D. Donahue, H. Acar és S. Wilhelm, „Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143. évf., 68–96. old., 2019, ISSN: 18728294. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.008. cím: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>.
- [5] J. Chen és J. X. Zhao, „Upconversion nanomaterials: Synthesis, mechanism, and applications in sensing“, *Sensors*, 12. évf., 2414–2435. old., 3 2012. márc., ISSN: 14248220. DOI: 10.3390/s120302414.
- [6] G. Liang, H. Wang, H. Shi és tsai., „Recent progress in the development of upconversion nanomaterials in bioimaging and disease treatment“, *Journal of Nanobiotechnology*, 18. évf., 1. sz., 1–22. old., 2020, ISSN: 14773155. DOI: 10.1186/s12951-020-00713-3.
- [7] R. Naccache, F. Vetrone és J. A. Capobianco, „Lanthanide-doped upconverting nanoparticles: Harvesting light for solar cells“, *ChemSusChem*, 6. évf., 8. sz., 1308–1311. old., 2013, ISSN: 1864564X. DOI: 10.1002/cssc.201300362.

- [8] A. Campbell és C. Wu, „Chronically implanted intracranial electrodes: Tissue reaction and electrical changes“, *Micromachines*, 9. évf., 9 2018, ISSN: 2072666X. DOI: 10.3390/mi9090430.
- [9] *PDMS atomi struktúrája*. cím: <https://www.dreamstime.com/silicone-oil-poly%20dimethylsiloxane-pdms-silicone-polymer-chemical-structure-silicone-oil-closely-related-substances-used-image191112064> (elérés dátuma 2023. 10. 23.).
- [10] G. Commentary, „Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right“, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5. évf., 4. sz., 686–688. old., 2014.
- [11] R. S. Hebbar, A. M. Isloor és A. F. Ismail, *Contact Angle Measurements*. Elsevier B.V., 2017, 219–255. old., ISBN: 9780444637918. DOI: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00012-7.
- [12] *A kontaktszög és a határfelületi feszültségek*. cím: <https://tudasbazis.sulinet.hu/hu/szakkepzes/gepeszet/gepeszeti-szakismeretek-1/muanyagok-ragasztasa/a-muanyagragasztas-technologiaja> (elérés dátuma 2023. 10. 22.).
- [13] M. A. Ganzoury, N. K. Allam, T. Nicolet és C. All, „Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry“, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50. évf., 1–8. old., 2015, ISSN: 18790690. DOI: 10.1016/j.rser.2015.05.073. arXiv: NIHMS150003. cím: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>.
- [14] K. Akhtar, S. A. Khan, S. B. Khan és A. M. Asiri, *Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization*. 2018, 113–145. old., ISBN: 9783319929552. DOI: 10.1007/978-3-319-92955-2_4.
- [15] *A SEM-EDS analízis alapjai*, <https://rti-lab.com/techniques/sem-eds-analysis/>. (elérés dátuma 2023. 08. 02.).
- [16] A. C. Lazanas és M. I. Prodromidis, „Electrochemical Impedance Spectroscopy A Tutorial“, *ACS Measurement Science Au*, 3. évf., 162–193. old., 3 2023. jún., ISSN: 2694250X. DOI: 10.1021/acsmeasuresciau.2c00070.
- [17] H. Á. Csaba, „Polikristályos szilícium vékonyrétegek nanostruktúrálása“, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Villamosmérnöki és Informatikai Kar Elektronikus Eszközök Tanszék, 2013.
- [18] A. Zátonyi, „Fabrication and Characterization of Implantable Polymer Microinterfaces“, 2020. DOI: 10.18136/PE.2020.746.

- [19] S. Hunor, „Új, változtatható felépítésű, elektrokémiai bioérzékelő eszközök konstrukciója és alkalmazásuk“, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Villamosmérnöki és Informatikai Kar Elektronikai Technológia Tanszék, 2009.
- [20] *Gamry Reference 600 Potentiostat User's Manual*. cím: <https://manualzz.com/doc/o/ostoy/reference600potentiostatusersmanualmembranecellconnections> (elérés dátuma 2023. 10. 31.).
- [21] *Plazma kezelés lényege, lépései*. cím: <https://plasmatreatment.co.uk/pt/plasma-technology-overview/plasma-treatment-explained> (elérés dátuma 2023. 10. 21.).
- [22] F. Akther, S. B. Yakob, N. T. Nguyen és H. T. Ta, „Surface Modification Techniques for Endothelial Cell Seeding in PDMS Microfluidic Devices“, *Biosensors*, 10. évf., 11. sz., 2020, ISSN: 20796374. DOI: 10.3390/bios10110182.
- [23] R. G. Acres, A. V. Ellis, J. Alvino és tsai., „Molecular structure of 3-aminopropyl triethoxysilane layers formed on silanol-terminated silicon surfaces“, *Journal of Physical Chemistry C*, 116. évf., 10. sz., 6289–6297. old., 2012, ISSN: 19327447. DOI: 10.1021/jp212056s.
- [24] *BCN-NHS szerkezete*. cím: <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/product/aldrich/744867> (elérés dátuma 2023. 10. 22.).
- [25] D. Svatunek, N. Houszka, T. A. Hamlin, F. M. Bickelhaupt és H. Mikula, „Chemoselectivity of Tertiary Azides in Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions“, *Chemistry - A European Journal*, 25. évf., 3. sz., 754–758. old., 2019, ISSN: 15213765. DOI: 10.1002/chem.201805215.
- [26] L. Lu, V. T. Duong, A. O. Shalash, M. Skwarczynski és I. Toth, „Chemical conjugation strategies for the development of protein-based subunit nanovaccines“, *Vaccines*, 9. évf., 6. sz., 2021, ISSN: 2076393X. DOI: 10.3390/vaccines9060563.
- [27] S. J. Siegl, J. Galeta, R. Dzajak, M. Dracinsky és M. Vrabel, „Bioorthogonal Fluorescence Turn On Labeling Based on Bicyclononyne Tetrazine Cycloaddition Reactions that Form Pyridazine Products“, *ChemPlusChem*, 84. évf., 493–497. old., 5 2019. máj., ISSN: 21926506. DOI: 10.1002/cplu.201900176.
- [28] „Structurally optimized tetrazines for rapid biological labeling“, 9557. old., 2018.
- [29] M. Bojtár, K. Németh, F. Domahidy és tsai., „Conditionally activatable visible-light photocages“, *Journal of the American Chemical Society*, 142. évf., 35. sz., 15164–15171. old., 2020, ISSN: 15205126. DOI: 10.1021/jacs.0c07508.

- [30] R. B. Sekar és A. Periasamy, „Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations“, *Journal of Cell Biology*, 160. évf., 629–633. old., 5 2003. márc., ISSN: 00219525. DOI: 10.1083/jcb.200210140.
- [31] A. B. D. Nandiyanto, R. Oktiani és R. Ragadhita, „How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material“, *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4. évf., 1. sz., 97–118. old., 2019, ISSN: 25278045. DOI: 10.17509/ijost.v4i1.15806.
- [32] *Infrared Spectroscopy Absorption Table, LibreTexts Chemistry*. cím: https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table (elérés dátuma 2023. 07. 08.).
- [33] E. Castagnola, A. Ansaldo, E. Maggolini és tsai., „Smaller, softer, lower-impedance electrodes for human neuroprosthesis: A pragmatic approach“, *Frontiers in Neuro-engineering*, 7. évf., APR 2014. ápr., ISSN: 16626443. DOI: 10.3389/fneng.2014.00008.
- [34] G. Márton, „Development and characterization of novel microelectrode arrays for neurophysiology“, Semmelweis University János Szentágothai School of Neurosciences, 2015.