

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Integrált optikai struktúrák fejlesztése, különös tekintettel az orvos-diagnosztikai alkalmazásokra

Ph.D. értekezés tézisei

Petrovszki Dániel

Témavezetők:

Dr. Dér András, tudományos tanácsadó

Dr. Valkai Sándor, tudományos munkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biofizikai Intézet

Biomolekuláris Elektronika Kutatócsoport



Szeged

2023

Közlemények listája

A PhD dolgozat alapját képező közlemények listája

- I. Petrovszki D,** Valkai S, Gora E, Tanner M, Bányai A, Fürjes P, & Dér A. An integrated electro-optical biosensor system for rapid, low-cost detection of bacteria. *Microelectronic Engineering*. 2021; 239,111523. IF: 2.662
- II. Petrovszki D***, Krekic S*, Valkai, S, Heiner Z, & Dér A. All-Optical Switching Demonstrated with Photoactive Yellow Protein Films. *Biosensors*. 2021; 11(11),432. IF: 5.743
- III. Petrovszki D***, Walter FR*, Vigh JP, Kocsis A, Valkai S, Deli MA, & Dér A. Penetration of the SARS-CoV-2 Spike Protein across the Blood–Brain Barrier, as Revealed by a Combination of a Human Cell Culture Model System and Optical Biosensing. *Biomedicines*. 2022; 10(1), 188. IF: 4.757

Összesített impakt faktor: 13.162

1. Bevezetés

A közelmúltban a bioszenzorok meghatározó részei lettek az orvosi diagnosztika eszköztárának. Így például mindennapos használati tárgyakká tekinthetők a terhességi tesztek, vagy akár a vércukorszint-mérő eszközök is. A bioszenzorok feladata az adott analit – pl. fehérje, vírus, baktérium stb. – gyors, specifikus, érzékeny, megbízható detektálása valamilyen fizikai jel – pl. elektromos, optikai, tömeg stb. – megváltozása által biológiai mintából, így például testfolyadékából. Egyes bioszenzorok esetében az érzékeléshez jelölőket használnak (pl. fluoreszcens festéket, a nagy érzékenység eléréséhez). Mindazonáltal a jelölésmentes kialakítások a kellő érzékenység mellett költséghatékony módon, esetenként egyszerűbb technikával képesek működni, ami alkalmazásuk szempontjából teszi őket ígéretessé. Ilyeténképpen az orvosi diagnosztikában potenciálisan felhasználhatók gyors teszteként, a hagyományos laboratóriumi tesztek megfelelő alternatíváját nyújtva. Így adott kórokozó vagy patológias állapot kimutatható lehet gyorsan, felhasználóbarát módon, hordozható formában. Ennek jelentősége lehet egyrészt a betegágy mellett („point-of-care”, POC) a diagnózis gyors felállításában és a megfelelő kezelés elindításában. Másrészt, mind helyszíni, "on-site", tesztelésre is felhasználhatók lehetnek, amely által akár háztartásokban is elvégezhető az adott diagnosztikai teszt. Ezen felhasználások jelentősége az elmúlt, koronavírus („severe acute respiratory syndrome coronavirus 2”. SARS-CoV-2) okozta pandémias időszakban (COVID-19) is megmutatkozott, ahol mind a járványterjedés kontrollja, mind a gyors diagnózis felállításában kulcsszerep jutott a gyors teszteknek, amely esetenként életmentő lehetett. Megvalósításukhoz megoldást kínál chiplaboratóriumi („lab-on-a-chip”, LOC) eszközökbe történő integrálásuk, ahol mikrofluidikai csatorna-rendszerrel egészülhetnek ki. Ezáltal kis mennyiségű biológiai folyadékminta kezelése, szenzorhoz juttatása, valamint a mintában lévő patogének gyors, specifikus és érzékeny detektálása elvégezhető ugyanazon chipen.

A fent említett alkalmazásokhoz a jelölésmentes optikai bioszenzorok nyújtanak ígéretes alternatívát. Ezek integrált optikai (IO) megvalósításai lehetővé teszik a kórokozók kimutatását a kívánt miniaturizált, hordozható és érzékeny módon. Az ilyen rendszerekben a fény hullámvezető struktúrában terjed teljes visszaverődésekkel, az érzékelés pedig a tulajdonságaiban bekövetkező változások alapján valósul meg. A terjedés során a fény a hullámvezető környezetébe is bejut, ez az evaneszcens tér. A felületre anyag kötődhet ki, ennek eredményeképp a hullámvezetőben terjedő fény fázisa megváltozhat, illetve az ki is szóródhat a környező közegbe. Ezek a kölcsönhatások kihasználhatók biokémiai reakciók specifikus

kimutatására a hullámvezető felületének biológiai felismerő elemekkel való bevonásával, úgynevezett funkcionalizálással. Így lehetővé válik a reakció érzékelésén keresztül az adott analit gyors, érzékeny és specifikus kimutatása. Ezen sajátosságot alkalmazza különböző módokon az integrált optikai bioszenzorok többsége. Ezek között található interferometrikus kialakítások, pl. az egyik legérzékenyebb, ún. Mach-Zehnder interferométer (MZI) elrendezés. Ebben a fény egyetlen bevezető szakaszban halad, majd két egyenlő hosszúságú karban – referencia- és mérőkar – terjed tovább, amelyek később csatlakoznak, egyetlen kivezető szakaszban végződve. A patogének mérőkar felületére kötődése a benne terjedő fény fázisváltását okozza. A két karban terjedő fényhullámok találkozásával interferencia keletkezik, amely a struktúrából kijutó fény intenzitás-változásaként adja a vizsgált jelet. A működési elvből fakadóan az eszközzel történő mérések során a környezeti paraméterekben – pl. hőmérséklet, páratartalom – bekövetkező változások is képesek hatással lenni a mérés érzékenységre és stabilitására. Ezen hatások kompenzálhatók az interferométer munkapontjának hangolásával. Ide vonatkozóan az egyik alkalmazott technika lehet a referencia-ág környezetében a törésmutató termo-optikai úton történő megváltoztatása.

A bioszenzorok alkalmazhatóságának egyik kulcseleme az érzékenyséjük, amit meghatároz az érzékelő térrészbe került analitok száma. Ennek megfelelően az említett integrált optikai bioszenzorok is érzékenyebbé tehetők a hullámvezető felületére, az evaneszcens-térbe, jutó patogének mennyiségének növelésével. A célsejtek polarizálhatóságát alapul véve ez elérhető a dielektroforézis (DEP) jelenségének felhasználásával. Ezt a technikát impedancia-mérésen alapuló bioszenzorok esetén széleskörben alkalmazzák folyadékmintában lévő biológiai anyagok, pl. extracelluláris vezikulák, baktériumok manipulációjára, azok felületi elektródákra gyűjtésével. Kísérleteink során ezt a technikát kívántuk felhasználni evaneszcens-tér érzékelésen alapuló bioszenzor-rendszerbe integrálva.

Célkitűzések

Munkám fókuszában integrált optikai struktúrák tervezése, elkészítése állt, ezek potenciális orvosi diagnosztikai felhasználása céljából. Ennek megvalósítására integrált optikai, evaneszcens-tér-érzékelést végző bioszenzorokat kívántam kifejleszteni, kórokozók folyadékmintából történő kimutatására. Ezek alapul szolgálhatnak betegség melletti, költséghatékony klinikai gyorsesztekhez. Így az eszközöket üveghordozón létrehozott, mikrofluidikai csatornába integrált hullámvezetők formájában terveztem meg ([T1, T2]).

1. Első alkalmazásként, munkám során egy olyan integrált optikai bioszenzort kívántam elkészíteni, amelynek evaneszcens tér alapú detektálási koncepciója alkalmas baktériumok testfolyadékokból való jelölésmentes, gyors, szelektív és érzékeny kimutatására.
 - A mérési elv alkalmazhatóságát *Escherichia coli* (*E. coli*) baktériumsejtek szuszpenzióból történő kvantitatív kimutatásával kívántam demonstrálni.
 - A kimutatás alapja a látható vörös fény evaneszcens hullámainak szóródása a célsejteken. Az így kialakult szóródási mintázatának elemzése lehetővé teszi a folyadékmintában lévő baktériumok koncentrációjának meghatározását.
 - A készülék érzékenységének növelése érdekében alkalmazható a váltakozó elektromos térrel létrehozott dielektroforézis a célsejtek összegyűjtésére a hullámvezető csíkok közelében elhelyezett elektródák felületén.
 - A dielektroforézis részecskékre gyakorolt hatásának méretfüggése lehetőséget ad patogének szelektív gyűjtésre és detektálására. Ennek tesztelésére a baktériumok kimutatását gyulladáson alapuló állapotban lévő vizeletet imitáló, szomatikus sejteket – ez esetben endotélsejteket – is tartalmazó mesterséges vizeletmintában kívántam megvalósítani.
2. Második alkalmazásként egy miniatűr Mach-Zehnder-interferométer alapú bioszenzor kifejlesztését céloztam meg, vírusfehérjék specifikus, mennyiségi kimutatására. Az interferometrikus mérési elvnek köszönhetően a célfehérjék gyors, pontos detektálása végezhető el. Az eszközzel a koronavírus (SARS-CoV-2) fertőzés potenciális neuroinvasív jellegét kívántam vizsgálni. A vírus és alegységeinek biológiai gáton való áthaladása nagyon aktuális és intenzíven kutatott téma. Nemrégiben megállapították, hogy a SARS-CoV-2 transzcellulárisan átjut egér és hörcsög primer agyi endotél sejtkultúra-modelleken anélkül, hogy megváltoztatná a szoros kötések expresszióját. Azt feltételezték, hogy az S1 alegység egerekben adszorpcióval közvetített transzcitózis révén jut át a BBB-n. Biológus kollégáink korábban több *in vitro* rendszert is kidolgoztak a humán vér-agy-gát, illetve egyéb biológiai gátrendszerek modellezésére. Mivel a COVID-19 gasztrointesztinális tünetekkel is járhat, a kísérleti elrendezést a bélepitélum vizsgálatára is ki akartuk terjeszteni, amihez a Caco-2 sejtek tenyésztése szolgáltatta a megfelelő sejtmodellt.
 - Konkrét célként azt tűztem ki, hogy olyan integrált optikai bioszenzort hozzak létre, amely alkalmas a koronavírus felületi S1 tüskefehérjéjének az *in vitro* humán vér-agy-gát, illetve bélhám biológiai gátrendszer modelleken való átjutási képességének jellemzésére. Ezért kísérleteket terveztünk a bioszenzorral a - kooperációs partnereink

által készített biológiai gátrendszer-modelleken elvégzett permeabilitásvizsgálatok során esetlegesen átjutott - tüskefehérjék specifikus, mennyiségi kimutatására.

- A specifikus detektálás elérésére az interferométer mérőágának hullámvezető-felületét specifikus S1 fehérje antitesttel kívánjuk funkcionalizálni.
- Az ilyen interferometrikus mérések érzékenységének beállítása érdekében az interferométer szinuszos átviteli függvényének munkapont-beállítása alkalmazható. E célból a hullámvezetőt körülvevő közeg törésmutatóját kívántam termo-optikailag modulálni a környező hőmérséklet változtatásával. Ez megvalósítható az interferométer referenciakarja közelébe helyezett arany fűtőszálra adott egyenárammal (DC) a detektálás során.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Bioszenzorok tervezése és elkészítése

A doktori értekezésemben bemutatott mindkét bioszenzor-konstrukció ugyanazokból a komponensekből épül fel. Mikroszkópos fedőlemezen arany felületi mikrostruktúrákat és polimer hullámvezetőket alakítottam ki, azokat egy szilíciumalapú polimer mikrofluidikai csatornával egyesítve. Az eszközök tervezése és elkészítése - alkalmazásuktól függően kisebb eltérésekkel ugyan, de - ugyanazon folyamatot követték. Így először felületi arany mikrostruktúrákat, illetve polimer hullámvezetőket hoztam létre az üveghordozó felületén. Ezek mintázatait a hordozóra spincoatingos technikával felvitt ultraibolya fény érzékeny, epoxialapú fotopolimerek - ún. fotorezisztok - rétegeiben alakítottam ki maszk nélküli, direkt lézerírási fotolitográfiai technikával ($\mu\text{PG-101}$ eszköz, $\lambda = 375 \text{ nm}$, Heidelberg Instruments GmbH). A strukturakészítés során mind ún. pozitív, mind pedig negatív fotorezisztet felhasználtam, a gyártók protokolljait követve. (Előbbiben a keresztkötéseket a megvilágítás bontja meg a rétegben, utóbbiban viszont ugyanennek hatására keresztkötések keletkeznek.) Először a felületi arany mikrostruktúrák mintázatait tartalmazó maszkokat alakítottam ki pozitív fotorezisztben. (Ez az elektro-optikai bioszenzorban elektróda-párokból álló elektróda-rendszert, míg az integrált optikai interferométer esetén, egy referenciaághoz helyezett fűtőszálstruktúrát jelentette). Ezt követően az üveghordozót katódporlasztással homogén króm-, majd aranyréteggel vontam be a maszk mintázatában. Az elkészült, arany mikrostruktúrákat tartalmazó üveglemezen alakítottam ki a hullámvezető-struktúrákat. Látható vörös fényre vonatkoztatva, az elektro-optikai bioszenzornál az elektródapárok közötti résben egy több fénymódus vezetésére képes csíkot, a második alkalmazásnál pedig egymódusú, Mach-Zehnder

interferométer mintázatot hoztam létre, szintén direkt lézerírásos technikával. Mindkét esetben hullámvezető-készítésre fejlesztett fotopolimerekből készítettem el a struktúrákat, az előbbi esetén EpoCore, a másikonál SU-8 negatív fotopolimer anyagból (micro resist technology GmbH). Ezután a bioszenzor-komponenseket tartalmazó fedőlemezre szilíciumalapú, polydimethyl-siloxane (PDMS) mikrofluidikai csatornát illesztettem, így a csatornába kerültek a detektálás alapjául szolgáló hullámvezető-struktúrák. Az ún. „soft-litográfias” technikával készített mikrofluidikai csatornát oxigénplazmás kezelés segítségével rögzítettem az üveghordozóra. A mérések során a csatornák be- és kivezető nyílásaiba illesztett pipettacsúcsokon, illetve gumicsöveken keresztül csatlakoztattam a fecskendőbe feltöltött folyadékmintát.

2.2. Hullámvezető bionfunktionalizálása specifikus detektáláshoz

Az IO MZI bioszenzorral történő detektálás során a tüskefehérje S1 alegységének specifikus felismerése a fehérjespecifikus antitestekkel bevont mérőkar hullámvezető-felületén lejátszódó immunológiai antigén-antitest kölcsönhatással történt. Ehhez – etanolos atmoszféra követően – antitest-aktiváló reagenssel (Mix&Go oldat 1:20 arányban MilliQ deionizált vízzel hígítva, AnteoTech Ltd.) töltöttem fel a csatornákat. Ezt követően – szobahőmérsékleten történt 30 perces inkubálás után – foszfátpufferes sóoldattal (PBS) (1x, pH=7,4), majd SARS-CoV-2 - specifikus antitest-oldattal (MonoRab™, BS-R2B2, GenScript, 1×PBS-sel hígítva 5 µg/ml végkoncentrációban) kezeltem a MZI karjait. A mintákat egy éjszakán át inkubáltam 4 °C-on. Mérések előtt, a nem kötött antitesteket mosással eltávolítottam, ami egyúttal az MZI karjainak környezeti törésmutató-illesztését is jelentette. Ehhez a permeabilitásvizsgálatok során alkalmazott puffert használtam fel (0.1%-os szarvasmarha-szérumalbumin (BSA)-Ringer-HEPES (RH) puffer).

2.3. Baktériumokat tartalmazó folyadékminták készítése

Az elektro-optikai bioszenzor detektálás koncepcióját, optimalizálását és teljesítményét élő *E. coli* baktériumsejteket (nem-virulens, Dh5α törzs) különböző koncentrációban tartalmazó szuszpenziókkal teszteltem. Ehhez baktériumtenyésztést követően a médiumban („lysogeny broth”, LB) lévő sejtek szuszpenzióit készítettem el különböző sejt-koncentrációjú hígításokban (milliliterenkénti 10^2 - 10^6 kolóniaformáló egység („colony forming unit”, CFU). A tenyésztés utáni folyadékmintában a baktériumok koncentrációját (CFU/ml) szélesztéses technikával határoztam meg. A mérésekhez használt szuszpenziók hígítási törzsoldata LB és

ionmentes MilliQ vizet tartalmazott 1:9 arányban. Ez biztosította a feltételeit a DEP alapú sejtgűjtésnek a sejtek életképességének megtartása mellett.

A DEP-alapú sejtgűjtési technika szelektivitásának és az elektro-optikai bioszenzor gyakorlati alkalmazásának tesztelését szomatikussejtek– endotél (hCMEC/D3) – és élő *E. coli* baktériumsejtek keverékét tartalmazó mesterséges vizeletmintával végeztem. Itt a hígítási törzsoldat LB helyett mesterséges negatív vizelet mintát tartalmazott.

2.4. Optikai bioszenzorok mérési elrendezései

Az integrált optikai bioszenzorokkal végzett mérések során az adott eszközt egy invertált mikroszkóp (Zeiss Axiovert 200) mikropozicionálóval (DC-3K, Märzhäuser) ellátott motoros tárgyasztalára helyeztem. A mikroszkóphoz csatlakoztatott CCD-kamerával figyeltem a folyamatokat, illetve ezzel rögzítettem baktérium detektálás alapjául szolgáló képeket is. A folyadékok áramoltatását a mikrofluidikai apparátus biztosította. Ebbe beletartozott egy fecskendőpumpa (SP210IWZ, World Precision Instruments), a folyadékmintát tartalmazó fecskendővel, amihez szilikoncsövekkel csatlakoztak a csatornák nyílásai. Mindkét szenzor esetében elektromos vezetékek voltak kötve a felületi arany struktúrák (fűtőszál vagy elektróda-rendszer) érintkező pontjaihoz. Az elektro-optikai bioszenzor esetén a DEP-alapú sejtgűjtéshez szinuszos, különböző frekvenciájú váltakozó (AC) elektromos mezőt alkalmaztam egy függvénygenerátor (20 MHz 8020-as modell, Tabor Electronics) jelével. Ezt egy időzítő (Uniblitz VS14S2ZM1R1-21, Vincent Associates) négyszögjelével (1,4 s „ON” és 3,0 s „OFF”) triggereltem. Az interferométer alapú bioszenzor munkapontját egy egyenáramú tápegység (VLP 2403pro, Conrad Electronic) 0-4,6 V feszültségének hatására, a felületi arany fűtőszálon keletkező hővel állítottam be, termo-optikai módszerrel. Az integrált optikai bioszenzor bemenetéhez egymódusú optikai szállal (S630-HP, Thorlabs) csatoltam a lézerdióda vörös fényét, végcsatolási technikával. Az interferométer kimenetén megjelenő fényt hasonlóképpen juttattam egy fotoelektron-sokszorozóhoz (H5783-01, Hamamatsu). Ennek jelét ezután egy oszcilloszkópba (LeCroy 9310-L, LeCroy) továbbítottam és azzal regisztráltam. Az egyes bioszenzorokkal végzett méréseket minden esetben legalább két alkalommal megismételtem.

3. Eredmények és megvitatás

3.1. Elektro-optikai bioszenzor baktériumok kimutatására [T1]

3.1.1. Dielektroforetikus részecskegyűjtés optimalizálása

Az elektro-optikai bioszenzor érzékenységének növelése érdekében DEP-alapú sejtgyűjtés segítségével növeltem meg a kimutatandó baktériumok koncentrációját az érzékelő felület közelében. A DEP-alapú részecskegyűjtési képesség méretfüggő szelektivitásának tanulmányozására különböző átmérőjű (1 μm , 9 μm), ionmentes vízben szuszpendált poliszitirén mikrogöngy-keveréket áramoltattam át a csatornán, miközben váltakozó áramú elektromos mezőt (30 V csúcértékek közötti érték - „peak-to-peak” -, 5 MHz) kapcsoltam a hullámvezető nélküli mikrofluidikai csatornában kialakított vékonyrétegű felületi elektródákra. Ilyen paraméterek mellett sikerült elérni a kívánt, méret-szelektív részecskegyűjtést. Mikroszkópos megfigyelés alapján megállapítottam, hogy a kisebb göngyök az elektródák felületének közelében, az elektródapárok közötti résekben gyűltek össze, míg a nagyobb göngyök átáramlottak a csatornán. Következő lépésként a kisebb átmérőjű göngyökkel összevethető méretű *E. coli* baktériumok gyűjtése következett, azok szuszpenzióiból. Tekintettel a baktériumsejtek és a mikrogöngyök közötti dielektromos tulajdonságok, valamint az oldatok ionerősségei közötti különbségekre, az alkalmazott elektromos tér paramétereit, valamint a baktériumszuszpenzió oldószerének hígításait változtattam a sejtgyűjtő elektródarendszer teljesítményének vizsgálatához.

A váltakozó tér frekvenciáját 100 kHz és 5 MHz között, a szuszpenzió oldószerének desztillált vizes hígítását pedig 1x és 100x között változtatva végeztem el a baktériumok 30-perces gyűjtését, 10^4 CFU/ml baktériumkoncentráció mellett. A mikroszkópos megfigyelések alapján az alapesetben használt 5 MHz frekvencia, és az ionerősség 10x-es hígítása bizonyult ideálisnak, így a későbbi vizsgálatok során is ilyen paraméterekkel dolgoztam (30 V_{p-p} , 5 MHz, szinuszos jel).

3.1.2. A mérések kiértékelése

Céлом az volt, hogy a kiértékelést nagy nagyítású mikroszkóp nélkül is el lehessen végezni, amely esetben az egyedi baktériumok már nem különböztethetők meg. A dielektroforetikus befogott baktériumokat ezért a szuszpenziójukból a rajtuk szóródó evaneszcens hullámok alapján detektáltam, húszszoros nagyítású objektív segítségével. Az optimalizált paraméterek mellett az elektródák között kialakított optikai hullámvezető felületére begyűjtött

baktériumokon a hullámvezetőben terjedő fény evanescens teréből a fény kiszóródott, és az így létrejövő szórás képet detektáltam. Eközben az elektromos mezőt periodikusan, rövid impulzusokkal kikapcsoltam ("OFF állapot"), majd bekapcsoltam ("ON állapot"), hogy módosítsam a hullámvezető felülete és a célsejtek közötti adhézios kapcsolatot. Ez az evanescens hullámok szórás mintázatában változást eredményezett, amelyet a mikroszkópos elrendezés CCD kamerája a rendszer ugyanazon keresztmetszetéről rögzített. Ez a mérési koncepció szolgáltatta az alapot a baktériumsejtek kvantitatív detektálásához a rendszer különböző állapotaiban (OFF és ON) készült felvételei alapján. Az így kapott képpárok statisztikai feldolgozását MATLAB programmal valósítottam meg, nevezetesen az átlagos négyzetes hiba (MSE) és a korreláció kiszámításával, amelyek a szórt fény ON- és OFF-mintázatai közötti különbségeket írták le kvantitatívan. Ezzel a technikával a teljes detektálási idő körülbelül 40 perc volt.

Ugyanakkor további vizsgálatokat végeztem annak meghatározására, hogy mi az az alkalmazható felbontás, amelynél a rögzített szórtfény-képek mintázatának különbsége még jelentősnek tekinthető. Ezért 10^4 CFU/ml koncentrációjú baktériumszuszpenzió mellett a képeket különböző nagyítású objektívekkel (x4,7, x10, x20) rögzítettem és elemeztem. Az eredmények alapján a kontroll és a mérési képpárok MSE értékei között jelentős különbség volt kisebb nagyítású objektívekkel (x4,7, x10) készített képek esetében is. Ennek alapján kijelenthető, hogy a detektálási technika alkalmazható lehet olcsó, webkamera-nagyítású objektívekkel is, ami a hordozhatóságot is előrevetíti.

3.1.3. A kimutatási határ meghatározása

Az optimalizált mérési paraméterek ismeretében (x20 objektív, 30 V_{p-p}, 5 MHz, szinuszos váltófeszültség) vizsgálatokat végeztem a detektálási koncepció érzékenységére vonatkozóan. Ehhez az *E. coli* baktérium-sejtek koncentrációsorát (10^2 - 10^6 CFU/ml) használtam, és a hullámvezető felületére gyűjtött sejtek szórás mintázatait detektáltam. Megállapítottam, hogy a kontrollképek MSE-értékeihez képest a mérési képpárok („OFF” és „ON” állapotnál rögzített képek párosításai) értékei szignifikánsak voltak már 10-perces sejtgyűjtést követő detektálás során is, tehát jelentősen sikerült csökkenteni a teljes mérés időtartamát. Megmutattam továbbá, hogy a kontroll-képpárok, valamint a mérési képpárok elemzésével kapott MSE értékek közötti különbség még a 10^2 CFU/ml koncentrációjú mintánál is szignifikáns volt. Mivel 10 CFU/ml-nél ez már nem volt elmondható, a 10^2 CFU/ml koncentráció jelentette az eszköz kimutatási

határát. Az MSE-értékek különbsége felhasználható volt az eszköz kalibrációjához is. Az így kapott adatokra egy alkalmas kalibrációs görbét ($R^2 = 0,91$) illesztettünk.

3.1.4. Vizsgálatok szomatikus sejteket is tartalmazó művizelettel

A DEP-alapú baktériumsejt-gyűjtési módszer gyakorlati alkalmazhatóságát a gyulladásoz vizeletet modellező, baktériumokkal fertőzött és más szomatikus sejt típusokat is tartalmazó közeg esetén is teszteltem. Ezért e próbavizsgálat középpontjában a sejtgyűjtési eljárás szelektivitása állt, ahol az evaneszcens mező érzékelését is hullámvezető-szerkezettel végeztem. A mérésekhez *E. coli* (10^4 CFU/ml) és hCMC/D3 endotélsejt szuszpenziók keverékét tartalmazó mesterséges vizeletet áramoltattam át a csatornán, miközben AC elektromos mezőt alkalmaztam ($30 V_{p-p}$, 5 MHz). Megfigyelhető volt, hogy ez - a dielektroforézis méret- és frekvenciafüggése miatt - a különböző méretű sejtekre eltérő hatást gyakorolt. A baktériumok ($\sim 1-2 \mu m$) kitapadtak az elektródfelületekre, egyúttal a hullámvezetőkre, míg az endotélsejtek ($\sim 10 \mu m$) átáramlottak a csatornán. Következésképpen e sejtgyűjtési technika szelektivitását sikerült igazolni a testfolyadék fiziológiailag releváns körülményei esetén.

3.2. Integrált optikai Mach-Zehnder interferométer bioszenzor koronavírus S1 alegység biológiai gátrendszeren való átjutásának kimutatására [T2]

3.2.1. Termo-optikai munkapont-beállítás

A Mach-Zehnder interferométer termo-optikai munkapontbeállítása során a fűtőszálra adott egyenfeszültséget folyamatosan növeltem 0 V-ról 4,6 V-ra, miközben az interferométer kimenetének fényintenzitását mértem (vörös majd zöld mérőfény, 633nm, illetve 532nm). Az alkalmazott fűtőfeszültséggel 532 nm-es hullámhosszon a kimenő jel szélsőértékeit sikerült meghatározni. Ennél a technikánál a fűtés a hullámvezető környezetének helyi hőmérsékletében változást okoz, ami az MZI referenciakarjában terjedő fény fázisának eltolódása révén a kimeneti fény intenzitásának modulációjához vezet. A feszültség változtatásával így beállítható a fényintenzitás az átviteli függvény inflexiók pontjai valamelyikére, ahol a legnagyobb a detektálási érzékenység. Ezzel a módszerrel, 1-1,5 V alkalmazásával a mérési hullámhosszon (670 nm) a környezeti körülmények (például a hőmérséklet és a páratartalom) lassú változása okozta jelszint-elhangolódást kompenzálni lehetett a mérés (pár perces) időtartamára.

3.2.2. Mérési eredmények

A mérőkarokhoz tartozó csatornákon először a tüskefehérje S1 alegységét két különböző koncentrációban tartalmazó kalibrációs mintaoldatokat (2 és 20 $\mu\text{g/ml}$ 0,1%-os BSA-RH pufferben) áramoltattam át, miközben – az interferométer optikai kimenetéhez illesztett egymódusú optikai szálon keresztül – regisztráltam a fehérjeadszorpció hatására bekövetkező fényintenzitás-változást. Ezt követően a célfehérjének a két biológiai gátrendszer-modellen elvégzett permeabilitás-vizsgálataiból származó folyadékmintákkal végeztem el a fentiekhez hasonló méréseket. Ezek során a modellrendszerek tenyésztőbetéteinek porózus membránja feletti részébe, a tüskefehérje S1 alegységének 200 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú törzsoldatából a membrán alatti részbe, a gátrendszereken átjutott tüskefehérjék szuszpenzióit vizsgáltam. Ezenkívül kontrollmintákkal is végeztem kísérleteket. Így pl. a tüskefehérje nélküli modellekből származott a negatív kontroll, a pozitív kontrollt pedig sejtmentes modellekben a felső részbe juttatott tüskefehérje-törzsoldatból – az elválasztó porózus membránon keresztül – az alsó részbe átjutott tüskefehérjéket tartalmazó minta jelentette.

A fehérjementes, negatív kontroll minta – a vártak megfelelően – közel nulla háttérjelet eredményezett, mivel nem okozott jelentős változást a kimeneti intenzitásban. Ezzel szemben, a pozitív kontrollnál magas csúcsamplitúdók mutatkoztak, amelyek közel azonosnak bizonyultak a töményebb (20 $\mu\text{g/ml}$) kalibrációs minta jelével. A két gátmodellből származó céldatak ennél jóval alacsonyabb – és egymástól is eltérő – becsült fehérjekoncentrációkat mutattak. A BBB modellen a bioszenzor jele megközelítően megegyezett a 2 $\mu\text{g/ml}$ -es kalibráló oldat jelével. Mindeközben a Caco-2 sejtek esetében ennél alacsonyabb volt a jelszint. A kalibrációs minták jelei alapján az utóbbihoz tartozó koncentrációértéket is sikerült megbecsülnünk, ami körülbelül 0,5 $\mu\text{g/ml}$ -nek adódott. Az S1 tüskefehérje-alegység megfigyelt csökkent átjutása a Caco-2 sejtmodell esetében valószínűleg eltérő átjutási útvonalaknak tulajdonítható az epitelsejtekben.

Ezeket az eredményeket ugyanezen mintákkal végzett ELISA-tesztek is igazolták, tehát kijelenthető, hogy a jelölésmentes, specifikus és érzékeny, mindössze néhány perces mérési idővel megvalósítható bioszenzoros mérés megbízhatóan kimutatta a tüskefehérje gátrendszeren való áthaladását. Továbbá, ez az IO MZI bioszenzor eredendően hordozható és költséghatékony módon előállítható, ami szintén elősegíti POC vizsgálati eszközként való alkalmazhatóságát a vírus korai, hatékony kimutatására.

4. Összefoglalás

PhD-munkám első részében egy integrált elektro-optikai bioszenzort terveztem, készítettem el, illetve alkalmaztam képanalízis-alapú, jelölésmentes és gyors baktérium-detektálásra. A szenzor működési elvét élő, nem virulens *E. coli* baktériumok érzékelésével demonstráltam, azok szuszpenzióiból. Az érzékelési koncepció alapjául dielektroforetikus sejtgyűjtés, majd hullámvezető-felületen történő evaneszcens-tér érzékelés szolgált. A sejtgyűjtéshez alkalmazott váltakozó elektromos tér, illetve a mérőoldat paramétereit optimalizáltam. Az elektromos tér be- illetve kikapcsolása mellett rögzített szórási mintázatok képfeldolgozási elemzése segítségével kvantitatív detektálást sikerült megvalósítanom. A módszer nem igényli az egyedi sejtek megfigyeléséhez szükséges képfelbontást, lévén, hogy a hatékony képfeldolgozáshoz a szórási mintázatok különbözőségei szolgálnak alapul. Megmutattam, hogy megbízható képfeldolgozási eredmények kaphatók egy olcsó webkamerához hasonló nagyítású objektívvel (x4,7), ami alátámasztja az eszköz költséghatékony megvalósítását. A kísérleti módszer érzékenysége 10^2 CFU/ml kimutatási határral jellemezhető, amely releváns érték egyes kórokozók testfolyadékokban (pl. vizeletben) fellépő koncentrációja szempontjából. Ezenkívül, a 10 percig tartó – sejtgyűjtést is magában foglaló – mérési idő gyorsnak tekinthető, ami rövidebb, mint a hagyományos PCR vagy ELISA laboratóriumi technikák elvégzéséhez szükséges idő. Jóllehet, a bioszenzorral főként a baktériumok nonspecifikus detektálását valósítottam meg, azonban a dielektroforetikus sejtgyűjtés által, több vizsgálattal bizonyítani tudtam a méretszelektív érzékelés megvalósíthatóságát. A bioszenzor hullámvezető-felületének funkcionalizálásával pedig specifikus detektálás is elérhető lehet, és a képelemzési eljárás is további fejlesztési lehetőségeket biztosít.

Az alkalmazott bioszenzor és annak detektálási módszere tehát ígéretesnek mutatkozik az érzékenység, az alacsony előállítási költség és a gyors kimutatási folyamat tekintetében. Mindezek pedig hozzájárulhatnak ahhoz, hogy egy hasonló elven működő eszköz a jövőben diagnosztikai tesztként alkalmazható lehessen.

Az integrált optikai struktúrák másik alkalmazásaként egy Mach-Zehnder interferométer alapú bioszenzort készítettem, amelyet a SARS-CoV-2 koronavírus felületi tüskefehérje S1 alegységének gátrendszereken való átjutási képességének kimutatására használtam fel. A folyamat modellezéséhez két – a koronavírusfertőzésnek erősen kitett – emberi szerv, az agy és a bél *in vitro* biológiai gátrendszerét választottam ki. Így a tüskefehérje-fragmentum vér-agy gát, illetve bélepitél sejt-kultúra-rendszereken keresztül történő átjutása került kísérleteim fókuszába. Az alkalmazott permeabilitásvizsgálatok során a gátrendszer-modelleken átjutó S1

fehérjét tartalmazó folyadékokkal végeztem el a bioszenzoros méréseket. Az eszközzel így a gátrendszeren átjutott fehérje mennyiségének érzékeny, specifikus és gyors kvantitatív kimutatását valósítottam meg. Az interferométer optimális működéséhez, érzékenységének fenntartásához termo-optikai munkapont-beállítást végeztem. A mérésekkel pontosan meghatározható volt a gátrendszeren átjutott S1 fehérje mennyisége. Továbbá az is megállapítható volt, hogy az S1 fehérje a kétféle gáton eltérő mennyiségben tudott átjutni. A bioszenzorral végzett kísérleteim eredményei összhangban voltak a párhuzamosan elvégzett hagyományos immunológiai tesztek (ELISA) eredményeivel. Az integrált optikai Mach-Zehnder interferométer bioszenzorral végzett kísérletek alapján tehát bebizonyosodott, hogy ez az érzékelési megközelítés alkalmazható hasonló orvosi diagnosztikai célokra, így a SARS-CoV-2 emberi szervezetre gyakorolt káros hatásainak vizsgálatához is hozzájárulhat.