

HIDROGEL AGAROZE KAO BIOELEKTRONIČKO SUČELJE

Anja Mioković

(Dated: 24. siječnja 2021.)

Foto-kondenzatori su nedavno razvijeni opto-bioelektronički elementi temeljeni na organskim poluvodičima, sa svrhom aktuatorije biološkog sustava električnim pulsom. Na bioelektroničkom sučelju između optoelektroničkog elementa i živih stanica ili tkiva nužna je konverzija elektronskog u ionski transport, što je moguće ostvariti kapacitivnim ili faradajskim procesima. Kod interakcije sa tkivima dovoljno je optoelektronički element prisloniti na tkivo, dok je kod interakcije sa staničnim kulturama, kolonijama bakterija ili kvasaca nužno na optoelektroničkom elementu nasaditi željenu staničnu koloniju. Pri tome je na površinu organskog poluvodiča potrebno nanijeti sloj materijala koji ima višestruku ulogu - kao biokompatibilan materijal, te ionski električni vodič. Tijekom seminara pripremili su se i karakterizirali ionski vodljivi slojevi hranjivog medija temeljenog na agarozu niske temperature geliranja. Obavljeni su preliminarni eksperimenti u kojima se proučava utjecaj bežične optoelektroničke stimulacije na rast kolonija kvasaca.

I. UVOD

Bioelektronika je disciplina koja se bavi primjenom elektroničkih uređaja u biološkom tkivu, sa svrhom istraživanja ili terapije. Ne rijetka potreba u medicinskoj terapiji jest ugradnja elektroničkog uređaja u biološko tkivo s ciljem njegove stimulacije. Najčešći izvor energije takvih bioelektroničkih implantata su baterije. Ugradnja baterija u tijelo ima više mana: ograničeni vijek trajanja, relativno velika veličina, toksičnost elektrolita u njima, te ponekad nužnost za ugradnjom žica. Iz očitih razloga, nameće se potreba za stabilnjom i manje invazivnom alternativom. Jedno od mogućih rješenja je korištenje svjetlosti kao izvora energije, odnosno optoelektronička stimulacija biološkog tkiva. Svjetlost omogućuje visoku prostornu i vremensku rezoluciju stimulacije *in vitro*, a zbog djelomične transparentnosti biološkog tkiva na svjetlost iz područja crvene i rubne infracrvene valne duljine, moguća je i *in vivo* stimulacija dok god se meta nalazi u blizini površine kože (na dubini do 2 cm).¹

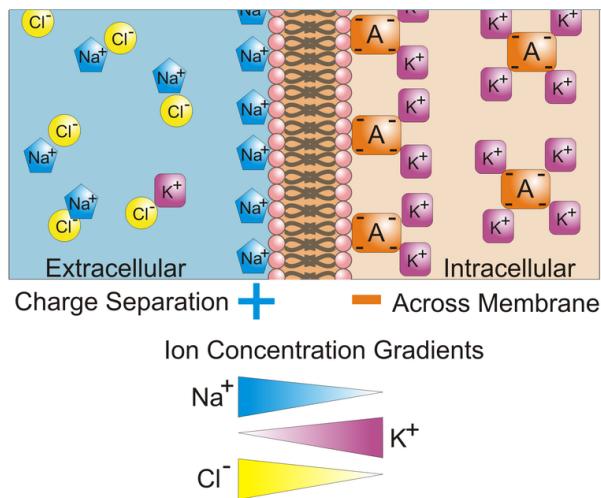
Organski poluvodiči ističu se po visokom koeficijentu apsorpcije svjetlosti, mehaničkoj fleksibilnosti, stabilnosti u mokrom mediju i biokompatibilnosti. Omogućuju izradu ultratankih i minimalno invazivnih bioelektroničkih uređaja, kakve nije moguće proizvesti tradicionalnim inorganskim materijalima. Usljed pobuđenja organskih poluvodiča svjetlošću može se javiti više efekata: foto-termalno zagrijavanje, foto-kemijske reakcije, foto-kapacitivno nabijanje i foto-faradajске reakcije.² Pri djelovanju na biološke stanice, foto-kapacitivno vezanje je najsigurniji i najučinkovitiji mehanizam optoelektronske stimulacije. Njime je smanjena vjerojatnost elektro-kemijske interakcije uređaja s okolnim medijem i tkivom, čime se izbjegavaju nepovratna oštećenja tkiva i uređaja. Nedavno je dizajniran obećavajući foto-osjetljiv kapacitivan bioelektronički uređaj optimiziran za staničnu (neuronsku) stimulaciju - organski elektrolitski foto-kondenzator (eng. *organic electrolytic photocapacitor*), ili skraćeno OEPC. Provedeni su eksperimenti u kojima su uspješno izvedene optoelektroničke stimulacije kortikalnih neurona miša i žabljih jajnih stanica *in vivo*.

*tro, a *in vivo* ishijastičkog živca štakora.*³ U navedenim *in vitro* eksperimentima, neposredno prije dovođenja u kontakt s OEPC-om, žive stanice su izolirane iz tijela domaćina, što nije uvijek moguće izvesti. Za uspješnu optoelektroničku stimulaciju staničnih kultura, kolonija bakterija ili kvasaca, nužno je staničnu koloniju nasaditi direktno na foto-kondenzatoru. U tom slučaju potrebno je koristiti bioelektroničko sučelje koje konvertira elektronski transport foto-kondenzatora u ionski transport stanica te je istovremeno pogodno za rast stanica. U ovom seminaru kao bioelektroničko sučelje pripremamo, karakteriziramo i testiramo hranjivi ionski hidrogel agaroze. Na njemu ćemo uzgajati kolonije kvasaca i provjeriti kako na njihov rast utječe opto-elektronička stimulacija postignuta foto-kondenzatorima obasjanima pulsom svjetlošću.

I.1. Električka stimulacija stanice

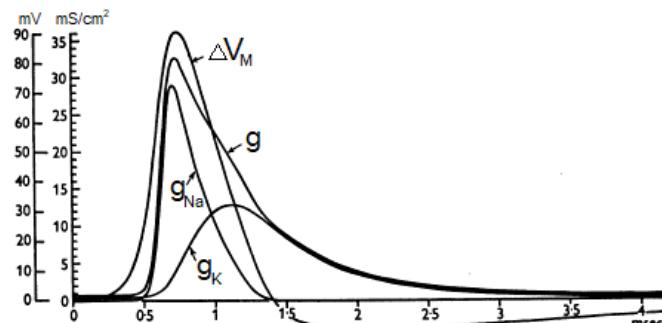
Stanična membrana kontrolira transport tvari unutar i izvan stanice. Građena je od selektivno propusnog fosfolipidnog dvosloja koji dopušta difuziju samo određenim molekulama (plinovi i male nenabijene molekule). Za transmembranski transport ostalih molekula zasluzne su, u fosfolipidni dvosloj ugrađene, bjelančevine koje tvore vodene i ionske kanale, transportere i ionske pumpe. U biološkim stanicama glavni nositelji naboja su ioni, stoga ćemo se opisati njihove koncentracije i transmembranski transport.

Ključni ioni za mogućnost električne stimulacije stanice su K^+ , Na^+ i Cl^- . Uobičajeno je ravnotežna unutarstanična koncentracija iona K^+ veća nego izvansustanična, dok za koncentracije iona Na^+ i Cl^- vrijedi obrnuto. Zbog različite koncentracije naboja unutar i izvan membrane (Slika 1) stanica posjeduje ravnotežni membranski potencijal V_m^0 , koji je za većinu stanica negativan (između -40 mV i -80 mV).⁶ Za održavanje V_m^0 zasluzne su ionske pumpe, koje koristeći energiju oslobodenu hidrolizom ATP-a šalju ione u smjeru gradijenta njihove koncentracije (aktivni transport). Ionski kanali omogućuju pasivni transport njima specifičnih



Slika 1. Ravnotežna raspodjela iona s unutarstanične i izvans-tanične strane membrane.

iona u smjeru gradijenta njihovog ionskog elektrokemijskog potencijala (uključuje efekt razlike koncentracija i razlike naboja). Postoji više vrsta ionskih kanala, koje se razlikuju po načinu kontrole vodljivosti kanala. Nama zanimljivi su naponski ionski kanali (eng. *voltage gated ion channel*). Oni se otvaraju ili zatvaraju pri promjeni membranskog potencijala, što ih čini pogodnom metom bioelektričkih uređaja. Bitna karakteristika različitih kanala je različita brzina reagiranja na promjenu potencijala. Ona je ključna u prenošenju električkih signala putem neurona. Ako se neuronska stanica depolarizira



Slika 2. Akcijski potencijal ΔV_M nastaje kao posljedica nalog toka iona Na^+ (vodljivost g_{Na}) u stanicu i zakašnjeli sporiji tok iona K^+ (vodljivost g_K). Ukupna neravnotežna vodljivost koja stvara akcijski potencijal je označena s g .

pomoću katode preko granične vrijednosti od $10 - 15 \text{ mV}$ u odnosu na V_m^0 naponski kanali koji propuštaju natrij se otvaraju trenutno i naglo zatvaraju, a otvaranje naponskih kanala koji propuštaju kalij se odvija s kašnjenjem i oni se zatim sporo zatvaraju. Dakle, posljedica depolarizacije neuronske stanice je nagla dodatna depolarizacija uzrokovana ulaznom strujom Na^+ , nakon koje slijedi odgođena sporija repolarizacija uzrokovana izlaznom strujom K^+ , što rezultira akcijskim potencijalom, prika-

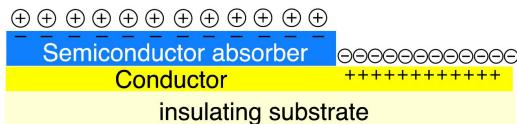
zanim na Slici 2. Valja napomenuti da je pokazano kako bi anodna stimulacija (hiperpolarizacija stанице) također mogla uzrokovati akcijski potencijal, ali tek uz značajno veći napon stimulacije.¹

Elektronička stimulacija stанице jest u suštini brza, trenutna i lokalizirana promjena potencijala membrane, koja uzrokuje neravnotežni transport iona kroz membranu i time diktira stanična električna svojstva. Opisana pojava izraženog akcijskog potencijala uslijed elektroničke stimulacije je specifična za neuronske i mišićne stанице, u čijim su membranama naponski ionski kanali vrlo gusto prisutni i u kojima se posljedično širenje električnog impulsa ili kontrakcija stанице može lijepo promatrati. Različite prokariotske i eukariotske stанице također pokazuju prisutnost naponskih ionskih kanala, čije uloge i način rada varira od vrste do vrste. U našem preliminarnom eksperimentu želimo pokušati elektronički stimulirati stанице pekarskog kvasca (lat. *Saccharomyces cerevisiae*). Odabir konkretno ovih stаницa ponajviše je potaknut činjenicom da su to stанице koje je lako i jeftino za nabaviti te se mogu jednostavno uzgojiti. Za stаницe kvasca je pokazano kako glavnu ulogu u transmembranskom transportu imaju protonska pumpa i ionski transporter, a ne ionski kanali.⁷ Dakle, za razliku od neuronskih stаница, u membrani kvaščevih stаница ionski kanali nemaju izraženu vodljivot niti su gusto prisutni. Međutim, uspješno je pokazana aktivnost kvaščevih ionskih kanala kalija pri elektroničkoj stimulaciji (s donjom granicom depolarizacije od 10 mV).⁸ Funkcija ionskih kanala kalija u kvascu nije potpuno razjašnjena, stoga nismo sigurni kakvo ponašanje očekivati, ali se nadamo da će prostorni raspored električnog polja utjecati na prostorni raspored rasta kvaščevih stаница. Napomenimo da glavni cilj ovog seminara nije razjasniti ponašanje kvasca pod utjecajem elektroničke stimulacije, već okarakterizirati hidrogel agaroze kao sučelje nužno za elektroničku stimulaciju staničnih kolonija, a na kojem bi se u budućnosti eventualno moglo uzgajati prikladnije stанице.

I.2. OEPС

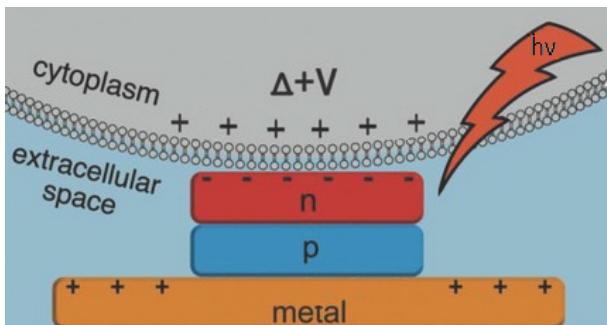
OEPС je uređaj građen od tankog trosloja metala i p-n organskog poluvodiča uronjenog u elektrolit, koji je u kontaktu i s metalom i s p-n dvoslojem. Materijali od kojih je građen p-n dvosloj su poluvodički kristalni pigmenti vezani vodikovom vezom, zahvaljujući kojima su izrazito stabilni u tekućim medijima. Konkretno, koristimo plavi bezmetalni ftalocijanin H_2PC kao p sloj i crveni derivat perilenskog diimida PTCDI kao n sloj. Pri obasjavanju OEPС-a fotonima crvene valne duljine, njih apsorbira samo plavi p sloj te se u njemu generiraju eksitonii (pod uvjetom da je energija fotona iznad *band gapa*). Eksitonii su kvazičestice koje mogu opstatи tek kratko vrijeme prije no što se elektron i supljina rekombiniraju. Kako je prosječan difuzijski put eksitona prije rekombinacije oko 30 nm , debljina p sloja od 30 nm garantira

da će većina nastalih eksitonata stići do sloja osiromašenja (između p-n sloja) u kojem se oni uslijed djelovanja električnog polja razdvajaju na slobodne elektrone i šupljine. Elektroni se gomilaju na n sloju, a pozitivne šupljine odlaže u metal. Ova raspodjela naboja uzrokuje stvaranje nabijenog područja na granicama metal-elektrolit i poluvodič-elektrolit koje se naziva električni dvosloj (eng. *electric double layer*), prikazanog na Slici 3. Maksimalna



Slika 3. Stvaranje električnog dvosloja prilikom uranjanja, poluvodičem djelomično prekrivenog, metala u elektrolit. Elektrolit nije posebno naznačen na Slici, ali podrazumijeva se njegova prisutnost.

moguća vrijednost stvorenog fotonapona U_{photo} je dana razlikom između kvazi-Fermijevog nivoa u ravnoteži i ruba vodljive vrpce n-tipa poluvodiča.⁴ U području iznad foto-kondenzatora stvara se električno polje. Ako se u njega dovede stanica, razlika potencijala s unutarne i vanjske strane njene membrane može biti dovoljno velika da stimulira otvaranje naponskih ionskih kanala i potakne transport iona između stanice i elektrolita u kojem se ona nalazi. (Slika 4)



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz djelovanja osvjetljenog OEPC-a na stanicu u njegovoj blizini.

II. PRIPREMA EKPERIMENTALNOG UZORKA

Konačni eksperimentalni uzorak našeg eksperimenta su Petrijeve zdjelice u čije su dno ugrađeni kružni foto-kondenzatori; ispunjene su tankim slojem hidrogela agaroze, a na njemu se razvijaju stanice kvasca. Priprema uzorka je vršena u dva glavna koraka. Prvi je bio uspješno proizvesti hidrogel agaroze, tako da bude tanak, jednoliko razmazan u Petrijevim zdjelicama i pogodan za rast stanica kvasca. Drugi korak je bio odrediti geometriju foto-kondenzatora, kojima želimo stimulirati stanice

kvasca, i evaporirati ih na željeni način na Petrijeve zdjelice.

II.1. Priprema hranjive otopine agaroze

Prvi korak u pripremi hranjive otopine agaroze je priprema ekstrakta kvasca. To je tipično korišten hranjivi medij u uzgoju kolonija mikroorganizama. Sastoji se od gradivnog materijala stanica kvasca s kojih su uklonjene stanične stijenke, čime se omogućava dostupnost hrane stanicama koje se uzgajaju. Za izradu ekstrakta kvasca, uz prikladnu izmjenu, praćen je recept dan na kulinarskoj web stranici¹⁰. U većoj posudi smo izmjesali 150 ml prehrambenog kvasca (deaktivirane stanice kvasca), 16 g saharoze i 5 g pekarskog kvasca (žive stanice kvasca), s oko 450 ml deionizirane vode. Posudu smo stavili na grijaču ploču (eng. *hot plate*) na 40°C i tako je ostavili u labosu preko noći. Tijekom tog vremena stanice kvasca uz pomoć saharoze rastu i stvaraju enzime kojima razgrađaju prehrambeni kvasac (i kasnije sebe). Na uspješnu fermentaciju ukazivao je alkoholni miris otopine idućeg dana, kada kreće dugotrajni postupak razaranja staničnih stijenki. Otopinu smo oko 3 sata držali zagrijanjom na 50°C uz povremeno miješanje, a zatim još 30 minuta 90°C, kako bi se termalno razorile stanične stijenke. Nakon što se otopina ohladila do sobne temperature, prelili smo ju u falkonice koje smo centrifugirali 10 minuta pri brzini od 2500 okretaja u minutu. Centrifuga odvaja razorene stanične stijenke od staničnog materijala i one se talože na dno falkonica. Tekući dio koji čini naš ekstrakt kvasca odvojili smo od taloga dekantacijom i pohranili u većoj posudi u hladnjak.

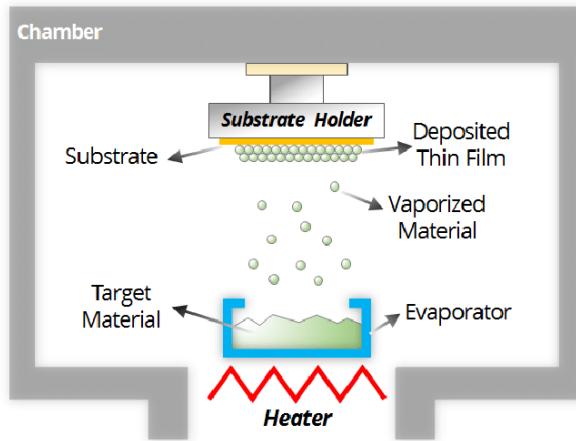
Kako bi hranjiva otopina gelirala, u njoj je potrebno otopiti agarozu (200 mg na 10 ml ekstrakta kvasca). Agaroza gelira na sobnoj temperaturi, dakle modificirana je u odnosu na obični agar koji gelira na 60°C. Uz agarozu, otapamo i aminokiseline (0,05 ml na 10 ml ekstrakta kvasca), koje služe kao dodatna hrana stanicama koje ćemo uzgajati. U početnim pokušajima uzgajanja kvasaca, otopali smo i natrijev klorid (83 mg na 10 ml ekstrakta kvasca), no u zadnjem pokušaju smo izbacili natrijev klorid s ciljem smanjenja vodljivosti hidrogela. Agarozu, aminokiseline i eventualni natrijev klorid postupno unosimo u falkonicu ispunjenu manjom količinom (ovisno koliko Petrijevih zdjelica pripremamo) ekstrakta kvasca, uz povremeno mučkanje. Zatim falkonicu držimo 15 minuta u vrućoj vodi (temperatura opada sa 100°C na 80°C) kako bi se sastojci potpuno otopili i nastala pjena slegnula. Hranjiva otopina je tada spremna za izливanje u Petrijeve zdjelice. Njenim hlađenjem se formira transparentan i homogen hidrogel, na kojem dalje uzgajamo pekarski kvasac.

Usavršavanje pripreme hranjive otopine vršeno je brojnim testiranjima u praznim Petrijevim zdjelicama. Tek kada smo tako uspješno uzgajili stanice kvasca, upustili smo se u pripremu hidrogela agaroze u Petrijevim zdjelicama s prethodno evaporiranim foto-

kondezatorima.

II.2. Evaporacija foto-kondenzatora

Termalna evaporacija (shematski prikaz na Slici 5) je najpraktičnija tehnika taloženja tankih slojeva različitih materijala u svrhu proizvodnje poluvodičkih uređaja.⁹ Ona se sastoji od dva osnovna procesa: materijal se zagri-



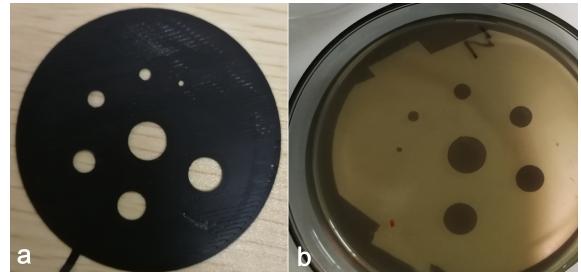
Slika 5. Shematski prikaz stvaranja tankog filma termalnom evaporacijom.

java do isparavanja (ili sublimacije), a zatim kondenzira na substratu gdje formira željeni tanki sloj. Evaporaciju smo vršili u komori u kojoj se, pomoću rotacijske i difuzijske pumpe, stvori vakuuum (tlak reda veličine 10^{-4} Pa). To sprječava sudare evaporiranih čestica materijala s nepoželjnim česticama u komori, čime se pospješuje njihovo jednoliko nanošenje na substrat.

Najprije smo na čitavu površinu dna plastičnih Petrijevih zdjelica evaporirali sloj zlata debljine 30 nm. Korištena debljina zlata je dovoljno vodljiva za naše potrebe, a istovremeno dovoljna tanka da zadrži željenu transparentnost na svjetlost. Kako bismo proizveli kružne oblike poluvodičkih p-n spojeva u pravilnom rasporedu, 3D printerom smo isprintali maske zasjenjenja (Slika 6.a) od PLA plastike. Njih smo pažljivo zalijepili na zlatni sloj Petrijevih zdjelica (PE-LD) te zatim evaporirali 30 nm debelim slojevima redom H_2PC -a (cplavi p sloj) i $PTCDI$ -a (crveni n sloj). Dobiveni su pravilni kružni poluvodički slojevi, oštrenih rubova, prikazani na Slici 6.b.

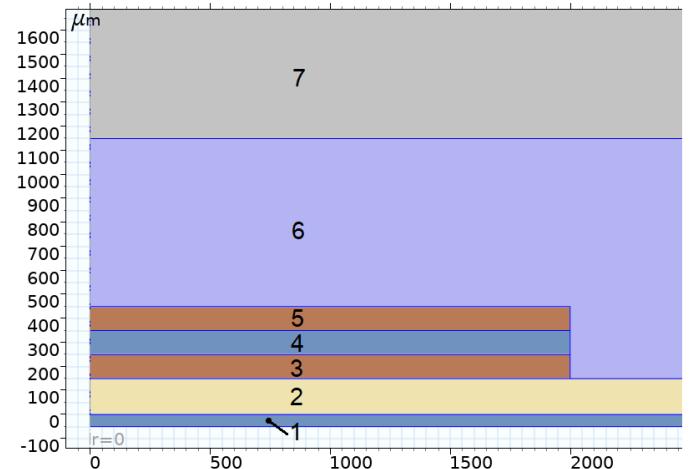
III. NUMERIČKO MODELIRANJE

S ciljem da što bolje razumijemo ponašanje hidrogela agaroze u ulozi bioelektroničkog sučelja, naš problem smo simulirali u programskom paketu *Comsol Multiphysics*, koji koristi metodu konačnih elemenata za numeričko rješavanje parcijalnih diferencijalnih jednadžbi zadanih



Slika 6. a) 3D printerom isprintana maska zasjenjenja korištena prilikom evaporacije p-n dvoслојa na sloj zlata u Petrijevoj zdjelici. b) Konačan izgled evaporiranih foto-kondenzatora.

fizikom problema (u našem slučaju su to Maxwellove jednadžbe), na mreži definiranoj geometrijom fizikalnog modela. Koristili smo elektromagnetski *AC/DC* modul, u kojem smo izradili 2D i 3D model našeg eksperimenta. Proučavali smo distribuciju električnog polja stvorenenog u hidrogelu, njegovu ovisnost o debljini i vodljivosti hidro-gela, te utjecaj promjene radijusa foto-kondenzatora.



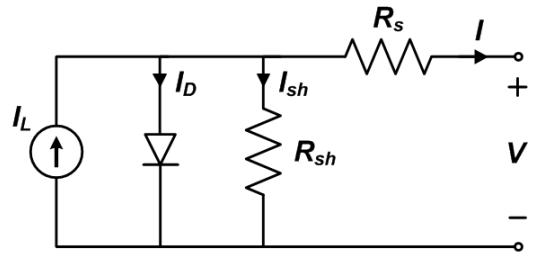
Slika 7. Poprečni presjek osnosimetričnog modela foto-kondenzatora u Petrijevoj zdjelici prekrivenog hidrogelom agaroze. Domene 1 – 7 redom predstavljaju: Petrijevu zdjelicu, zlato, p sloj, sloj osiromašenja, n sloj, hidrogel agaroze, zrak. Za zlato (2) i zrak (7) su korišteni isti materijali dostupni u biblioteci. Petrijeva zdjelica i sloj osiromašenja su izolatori te je za njih korišten prilagođen kvarc. p (3) i n (5) slojevi su vodiči za koje je korišten prilagođen bakar. Hidrogel agaroze (6) je podešen kao elektrolit čiju vodljivost možemo parametarski mijenjati. Visine domena 2 – 5 su, zbog boljeg pregleda, uvećane 25 puta u odnosu na model korišten u računanju. Radijusi p-n slojeva (3-4) se mogu parametarski mijenjati, a radijusi ostalih domena su tri puta veće. Visina hidrogela agaroze (6) se također može parametarski mijenjati.

Slika 7 prikazuje geometriju 2D modela s odgovarajućim materijalima. Model smo izradili tako da predstavlja 3D tijelo koje je osnosimetrično (oko osi $z = 0$), što nam omogućava praktičniji i brži račun, dok god u hidrogel ne uvedemo stanicu (čime situacija prestaje

biti osnosimetrična). Koristili smo materijale dostupne u biblioteci programskog paketa, tako da dio njih ne odgovara stvarno korištenim materijalima. Stoga smo, po potrebi, prilagodili vrijednosti vodljivosti i relativnih permitivnosti, jer su to jedine karakteristike materijala uključene u rješavanje našeg fizikalnog problema. Vrijednosti veličina, čiji utjecaj na stvoreno električno polje želimo promatrati, zadane su parametarski. To su: vodljivost i visina hidrogela agaroze te radijusi p-n slojeva, koji odgovaraju stvarnim radijusima evporiranih poluvodiča. Radijusi svih ostalih domena su tri puta veći od radijusa p-n slojeva, što u našem slučaju predstavlja beskonačno daleko područje gdje nema efekata uzrokovanih djelovanjem foto-kondenzatora. Nadalje, korištene visine domena koje predstavljaju foto-kondenzator su 200 puta veće u odnosu na stvarnost. Razlog tomu je značajna komplikacija s mrežom modela, koja nastaje ako želimo na tim domenama i području oko njih imati dovoljno male elemente mreže koji će korektno analizirati problem zadani sa stvarnim visinama. Za veliki broj takvih malih elemenata rješavanje problema se izrazito produljuje te se zauzima više radne memorije što dovodi u pitanje sposobnost računala da uopće obavi tako zahtjevan račun. Ipak, poučeni usporedbom rješenja za manje promjene debljine, jasno nam je da se apsolutne vrijednosti polja u istim točkama modela mijenjaju s nekim faktorom, no njihove relativne vrijednosti za različite točke ostaju iste, kao i distribucija električnog polja i ovisnosti koje promatramo, što trenutno zadovoljava naše potrebe. U budućnosti se planiramo posvetiti poboljšanju modela i simulaciji vjerodostojnijih vrijednosti električna polja.

Početni uvjet problema smo zadali postavljanjem napona svugdje na 0. Rubne uvjete smo postavili stavljanjem prikladnih (preuzetih iz prethodnih analiza¹¹) površinskih otpornosti i kapaciteta na granicama između foto-kapacitora i hidrogela te na granicama između p i n slojeva te područja osiromašenja. Stvaranje fotonapona u p-n sloju pod utjecajem pulsirajuće svjetlosti modelirali smo uvođenjem terminala preko kojih smo n i p sloj spojili sa ekvivalentnim strujnim krugom solarne čelije, prikazanim na Slici 8. Time su svjetlosni pulsevi zamijenjeni prikladnim pulsirajućim strujnim izvorom, s pulzvima u trajanju od 6 ms.

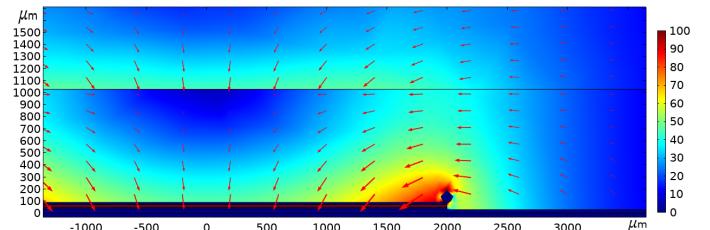
Za potrebe promatranja raspodjele potencijala u stanicu narasloju u hidrogelu agaroze, izradili smo 3D model sa analognom geometrijom i materijalima korištenim u 2D osnosimetričnom modelu. Dodanu stanicu smo modelirali kuglom, čija je unutrašnjost okarakterizirana elektrolitom prikladne vodljivosti. Staničnu membranu smo u model uveli pridruživanjem prikladne otpornosti i kapaciteta sferi koja obavlja stanicu. Također, za početni potencijal stanice smo uzeli vrijednost od -50 mV (V_m^0) što omogućava da u njoj postoji određeni višak negativnog naboja u odnosu na okolinu. Važno je istaknuti kako se nismo držali realne vrijednosti promjera stanica kvasca, koja iznosi oko $10 \mu\text{m}$, već smo koristili 10 puta veći promjer. Razlog tomu je već spomenuta komplikacija s potrebom za izrazito guste elemente mreže modela,



Slika 8. Ekvivalentna shema solarne čelije koja predstavlja stvaranje fotonapona $U_{photo} = V$ u našem p-n sloju. Vrijednosti veličina koji se pojavljuju u strujnom krugu su preuzete iz prethodnih analiza.¹¹ Karakteristike strujnog pulsog izvora odgovaraju karakteristikama korištene svjetlosne diode. Jakost struje kroz diodu I_D parametarski se mijenja proporcionalno kvadratu radijusa p-n dvosloja, a vrijednost paralelnog otpora R_{sh} obrnuto proporcionalno istome.

koja se dodatno komplificira korištenjem 3D modela. U budućem modeliranju se planiramo posvetiti tome problemu, i popraviti vjernost simulacije stанице.

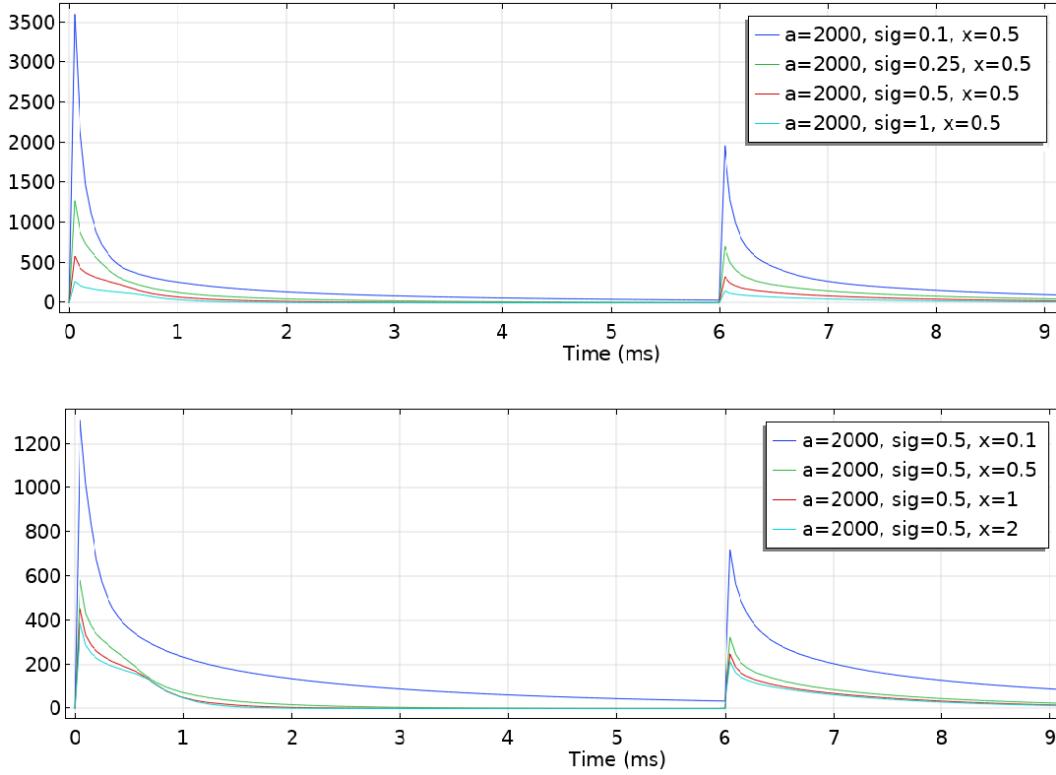
Simulacija distribucije električnog polja u početnom trenutku svjetlosnog pulsa ($t = 0,1 \text{ ms}$) prikazana je Slikom 9. Električno polje se osnosimetrično širi od po-



Slika 9. Prikaz električnog polja u ravnini koja presjeca stanicu u 3D modelu, u trenutku $t = 0,1 \text{ ms}$.

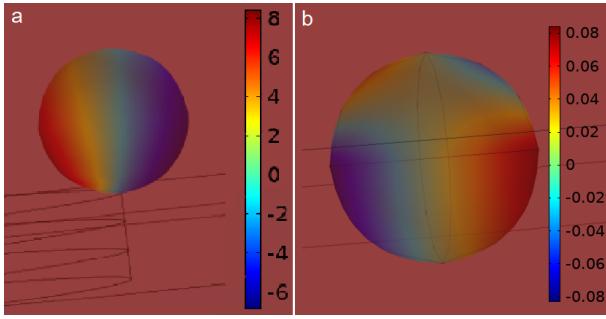
zitivno nabijenog sloja zlata prema, u njegovom centru smještenom, negativno nabijenom n sloju poluvodiča. Ovakva situacija vlada na samom početku pulsa. Na stvoreno električno polje reagiraju slobodni ioni u hidrogelu, koji se teže rasporediti tako da hidrogel bude ekvipotencijala (s električnim poljem u njemu jednakom 0). Pozitivni ioni u hidrogelu se nakupljaju na granici s n slojem, a negativni na granici sa slojem zlata, formirajući već spomenute električne dvosloje, što je analogno nabijanju kondenzatore. S nabijanjem kondenzatora jačina električnog polja približno eksponencijalno (detaljnija analiza u diplomskom radu¹¹) trne u vremenu. Kada su kondenzatori potpuno nabijeni električno polje u hidrogelu nestaje, sve do prestanka pulsa, kada se javlja nešto slabije električno polje, suprotnog smjera, koje odgovara izbijanju kondenzatora.

Važan je utjecaj granične površine između hidrogela i zraka. Kako je zrak izolator koji onemogućava tok iona, na toj površini također dolazi do njihovog nakupljanja.



Slika 10. Prikaz vremeske ovisnosti iznosa električnog polja u točki gdje očekujemo da je ono maksimalno (na radiljusu a koji odgovara radiljusu p-n dvosloja, i visini od $5 \mu\text{m}$ iznad). Gornji graf prikazuje kako se ta ovisnost mijenja s promjenom vodljivosti hidrogela (sig je faktor skaliranja u odnosu na vodljivost fiziološke otopine $1,25 \text{ Sm}^{-1}$), a donji s promjenom njegove debljine (x je faktor skaliranja u odnosu na debljinu 1 mm).

Prema Gaussovom zakonu, stvorena površinska gustoća naboja rezultira skokom u okomitoj komponenti električnog polja (E_z), što objašnjava diskontinuitet vidljiv u simulaciji.



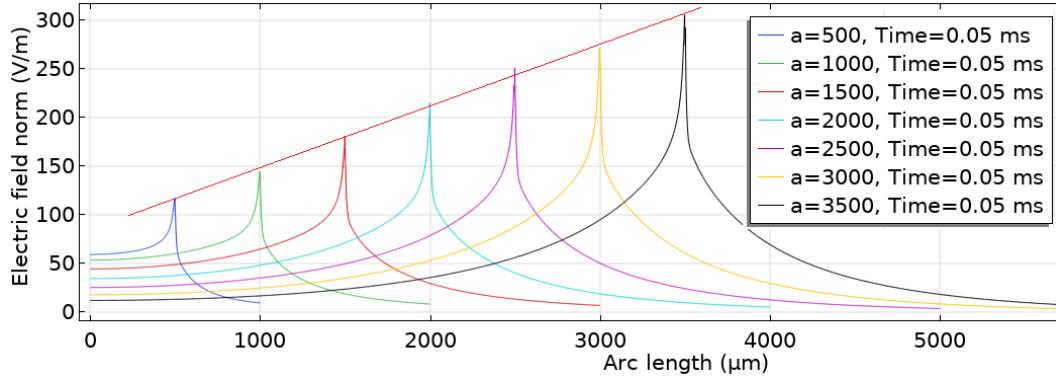
Slika 11. Odstupanje membranskog potencijala (u mV) u odnosu na njegovu ravnotežnu vrijednost u trenutku $t = 0,1 \text{ ms}$. Simulirano za stanicu radijusa $50 \mu\text{m}$: a) postavljenu na sam rub pn-dvosloja; b) postavljenu na granici hidrogel-zrak. Valjalo primjetiti da je depolarizacija za stanicu a) 100 puta veća nego za stanicu b).

Nadalje, valjalo primjetiti kako električno polje, već u trenutku $t = 0.1 \text{ ms}$, unutar stanice iznosi 0. Dakle, naboje u stanicama se gotovo trenutno preraspodjeli tako da

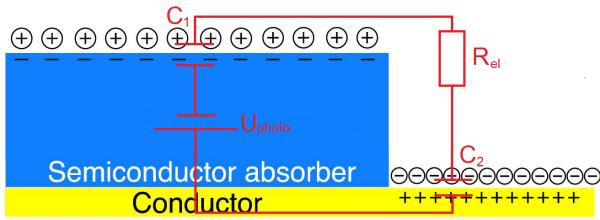
poništi vanjsko električno polje. Time jedan dio stanice postaje depolariziran, dok drugi hiperpolariziran, što na tim područjima mijenja potencijal membrane u odnosu na $V_m^0 = -50 \text{ mV}$. (Slika 11) Ako ta promjena prelazi graničnu vrijednost, vanjsko električno polje stimulira otvaranje naponskih ionskih kanala te transmembranski tok iona. Očekivano, velika je razlika (za faktor 100) između promjene membranskog potencijala u slučaju stanice koja raste uz sam foto-kondenzator (Slika 11.a) i one koja raste na granici hidrogela i zraka (Slika 11.b). Naravno, za stanice koje rastu negdje između ta dva područja, promjena membranskog potencijala brzo opada u skladu s opadanjem električnog polja.

Ovisnost električnog polja o vodljivosti i debljini hidrogela, kao i njegovo prethodno opisano ponašanje u vremenu, prikazani su grafovima na Slici 10. Vidljivo je kako električno polje na sličan način raste sa smanjenjem vodljivosti kao i sa smanjenjem debljine. Razlog tomu je jasan ako promotrimo hidrogel kao elektrolit otpora (R_{el}) serijski spojenog u strujni krug s kondenzatorima, koji predstavljaju električne dvosloje na granicama zlatohidrogel i p-n sloj-hidrogel. (Slika 13)

Donje strane ploča kondenzatora su na, svjetlosnim pulsem stvorenim, naponu U_{photo} . Razlika potencijala U_{el} između gornjih ploča kondenzatora proporcionalna



Slika 12. Prikaz iznosa električnog polja, duž površine $5 \mu\text{m}$ iznad p-n dvosloja, u ovisnosti o njegovom radijusu a . Crveni pravac prikazuje linearnu vezu između maksimalnih vrijednosti krivulja.



Slika 13. Ekvivalentna shema strujnog kruga koji čine električni dvosloji formirani prilikom uranjanja poluvodičem prekrivenog metala u elektrolit. (Sa sheme je izostavljen geometrijski kapacitet poluvodiča zbog jednostavnosti prikaza.)

je s R_{el} . Kada bi elektrolit imao beskonačno velik otpor (izolator), tok naboja kroz njega ne bi bio moguć te bi u svakom trenutku vrijedilo $U_{el} = U_{photo}$. Što je otpor elektrolita manji, protok iona je brži, te se brže uspostavlja njegova ekvipotencijalnost. Odnosno U_{el} kraće vrijeme prati porast U_{photo} , a zatim opada u 0. Nama je za stimulaciju stanice potrebna situacija u kojoj električno bolje u hidrogelu što dulje "preživljava", odnosno situacija sa hidrogelom koji će imati što veći otpor. Kako je otpor obrnuto proporcionalan vodljivosti i površini prečnog presjeka toka iona (koji je pak proporcionalan s debljinom hidrogela), jakost električnog polja u hidrogelu raste smanjenjem vodljivosti i debljine. Valja napomenuti kako smo *spin coating* tehnikom pokušali izraditi mikroskopsko tanki hidrogel agaroze, međutim kvasac nije rastao na tako tankim hidrogelovima, vjerojatno zbog manjka hrane. Stoga smo se zadržali na izradi rukom izlivenog hidrogela debljine između 0,5 i 1 mm. Vodljivost hidrogela smo smanjili izbacivanjem NaCl -a iz sastava hidrogela. Korisno je znanje da, za eventualnu buduću optoelektroničku stimulaciju nekih drugih kolonija, treba prije same stimulacije najprije otkriti minimalnu moguću debljinu i vodljivost koja dopušta rast tih stanica, čime se osiguravaju optimalni uvjeti za elektroničku stimulaciju.

Ponukani zaključkom da bi, zbog najveće jakosti električnog polja, stanice trebalo probati uzgojiti na samoj

površini foto-kondenzatora, provjerili smo kako se jakost električnog polja mijenja duž te površine - na visini od $5 \mu\text{m}$ (okviran radijus stanice kvasca) iznad n sloja. Dobivene različite distribucije za različite polumjere (a) p-n dvosloja prikazane su grafom na Slici 12.

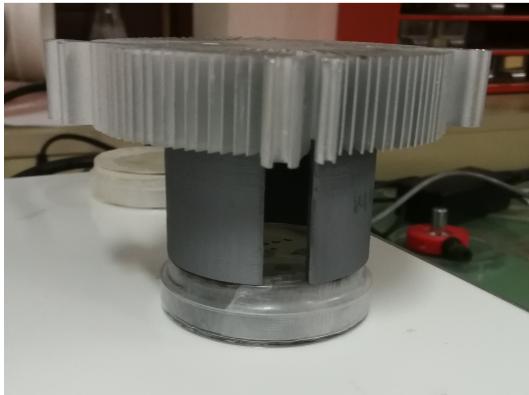
Vidljivo je kako se maksimalna vrijednost polja, koje nastaje u točki na samom rubu p-n dvosloja ($r = a$), linierno mijenja s porastom radijusa pn-dvosloja, što je u skladu s prethodno provedenim eksperimentima.⁴ Simetričnost opadanja tog polja, s pomicanjem prema sredini p-n sloja i od njega, mijenja se s radijusom. Za manje radijuse je polje iznad čitave površine p-n dvosloja iznosom relativno blisko maksimalnom polju. Za veće radijuse područje, gdje je jačina polja veća od polovine maksimalne vrijednosti, prilično je simetrično raspoređeno u odnosu na točku $r = a$; a u centru p-n dvosloja polje je gotovo nepostojeće. Zaključujemo da bismo moguće efekte optoelektroničke stimulacije stanica trebali primjetiti u različitim oblicima: iznad čitavog p-n dvosloja (krug) u slučaju najmanjeg foto-kondenzatora, a oko ruba p-n dvosloja (kružni vijenac) u slučaju najvećeg.

IV. EKSPERIMENTALNA METODA

IV.1. Uzgoj kvasca na foto-kondenzatorima

Pekarski kvasac smo uzgajali na tri različita način. Standardno na gornjoj površini hidrogela agaroze, volumno rasprostranjenog unutar hidrogela te, s ciljem postizanja maksimalnog mogućeg djelovanja polja na stanice, na površini između evaporiranih foto-kondenzatora i hidrogela. U prvom i trećem slučaju na ohlađeni hidrogel agaroze smo nanijeli 0,1% vodenu otopinu pekarskog kvasca. Tamo smo je držali 30 sekundi, tijekom kojih se stanice kvasca "prime" za podlogu, a zatim smo izlili višak vode. U prvom slučaju postupak je rađen na hidrogelu koji se već nalazio na evaporiranim Petrijevim zdjelicama, dok je u trećem slučaju hidrogel bio u praznim Petrijevim zdjelicama. Tako smo ga držali otprilike 15 minuta, čekajući da se stanice kvasca učvrste na svojim

položajima, a onda smo sterilnim nožićem izrezali kružni oblik hidrogela i pažljivo ga prilijepili stranom na kojoj rastu kvasci preko foto-kondenzatora u evaporiranoj Petrijevoj zdjelicu. Za dobivanje volumne raspodjele, direktno smo pomiješali pekarski kvasac s otopinom agaroze koja još nije gelirala, a zatim to izlili u Petrijevu zdjelicu s foto-kondenzatorima. Svaki od tri navedena eksperimenta je izvođen zasebno, zbog posjedovanja samo jedne pulsirajuće svjetlosne diode.



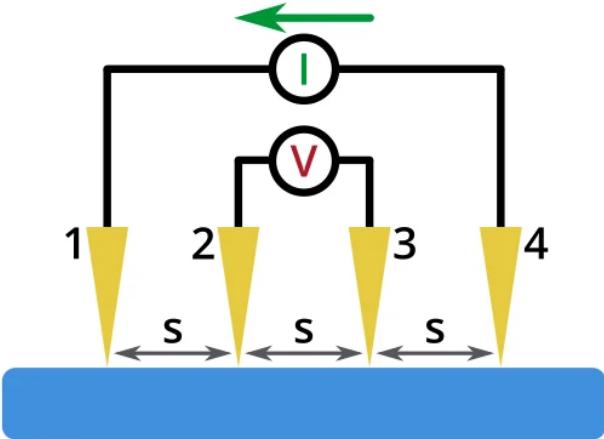
Slika 14. Eksperimentalni postav uzgajanja pekarskog kvasca pod utjecajem optoelektroničke simulacije. Dioda obasjava Petrijevu zdjelicu pulsirajućom crvenom svjetlošću.

Kako bi stanice kvasca uspješno rasle, Petrijevu zdjelicu smo oblijepili parafilmom (protiv isušivanja), a zatim smo ju postavili na grijajuću ploču na 20°C , okrenutu naopačke (agar gore), kako bi se sprječila kontaminacija uzorka mogućim kapanjem kondenzirane vode. Iznad nje postavljena je dioda (Slika 14) koja emitira crvenu svjetlost valne duljine 660 nm i intenziteta 50 mV/cm^2 , čiji pravokutni puls traje 6 ms i ponavlja se u razmacima od 500 ms . Na grijajuću ploču smo postavili i kontrolnu Petrijevu zdjelicu, pripremljenu s istom otopinom agaroze i istom vodenom otopinom pekarskog kvasca, ali bez foto-kondenzatora. Takav postav je ostavljen preko noći i duž idućeg dana u labosu.

IV.2. Mjerenje vodljivosti

Hranjivu otopinu agaroze sa i bez NaCl smo u debljem sloju ulili u dodatne Petrijeve zdjelice. Vodljivost tih slojeva smo mjerili metodom četiri kontakta, shematski prikazanoj na Slici 15. Tanak uzorak debljine t nepoznate vodljivosti (otpornosti) se putem dva točkasta vanjska kontakta spoji u strujni krug, a između njih se pomoću još dva točkasta kontakta mjeri pad napona. Ako se pretpostavi simetrično radikalno širenje gustoće struje uzorkom i uzme obzir mikroskopski Ohmov zakon:

$$j = \frac{I}{2\pi rt} = \sigma E$$



Slika 15. Shematski prikaz metode četiri kontakta.

, uz relaciju $\vec{E} = -\nabla V$, dolazi se do jednostavne diferencijalne jednadžbe:

$$\frac{dV}{dr} = \frac{-I}{2\pi\sigma tr}$$

Ona je rješiva separacijom, te se, za proizvoljan raspored naponskih kontakata (ne moraju biti nužno na istom pravcu i ekvidistantni, kao što je prikazano na Slici 15), dobiva veza između napona na unutrašnjim i struje na vanjskim kontaktima¹²:

$$V = \frac{I}{2\pi\sigma t} \cdot \ln \left(\frac{r_{13}r_{24}}{r_{12}r_{34}} \right)$$

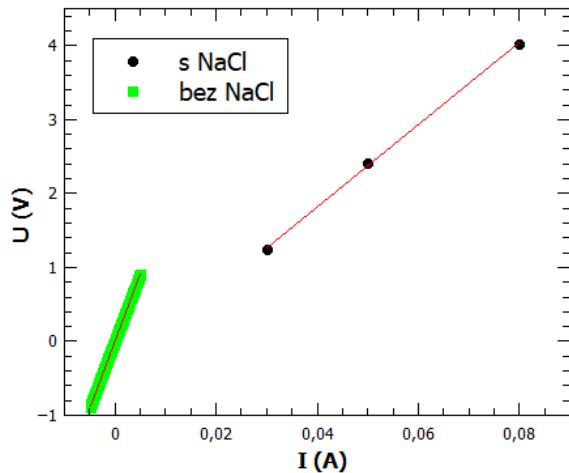
gdje je s r_{ij} označena udaljenost između kontakata i i j u skladu sa shemom na Slici 15.

Mjerenja ovisnosti napona o struci za hidrogel agaroze vršena su uz pomoć dva različita uređaja. Mjerenje vodljivosti hidrogela sa NaCl je izvedeno korištenjem napajajuće jedinice (eng. *power supply unit* ili PSU), a mjerenje vodljivosti hidrogela bez NaCl korištenjem napajajuće-mjerujuće jedinice (eng. *source measure unit* ili SMU). Dobiveni grafovi prikazani su na Slici 16. Linearnom regresijom dobivenih točaka, određeni su nagibi pravaca, iz kojih su zatim izračunate vrijednosti željenih vodljivosti:

$$\sigma(\text{sa NaCl}) = (1, 23 \pm 0, 02) \text{ Sm}^{-1}$$

$$\sigma(\text{bez NaCl}) = (0, 6277 \pm 0, 0003) \text{ Sm}^{-1}$$

Napomenimo da korišteni PSU ima prilično manju rezoluciju (minimalan iznos struje koju može mjeriti jest za naš sloj već značajnih $0,01\text{A}$) u udnosu na SMU koji smo koristili za drugo mjerenje. Također, na prvom uređaju smo struju morali ručno podešavati, dok je na drugom moguće strojno podesiti mjerenje napona za male promjene struje. Razlog različitih kvaliteta mjerenja leži u tome što bolji uređaj tijekom prvog mjerenja još nije bio dopremljen u labos. Ipak, iako je obavljeno za samo

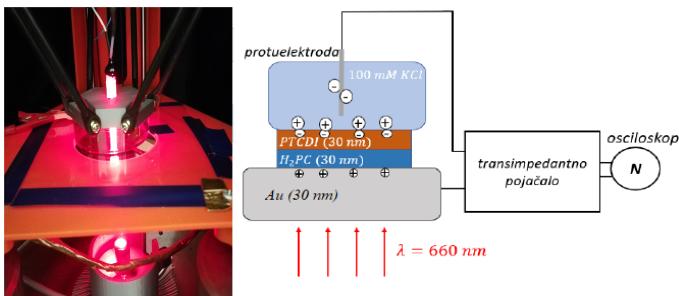


Slika 16. Linearna regresija izvršena na točkama dobivenim mjeranjima ovisnosti napona o struci metodom četiri kontakta. Vodljivost uzorka je obrnuto proporcionalna nagibu pravca.

tri različite vrijednosti struje, prvo mjerjenje je dalo vrijednost vodljivosti s relativnom pogreškom od samo 2%, stoga ga možemo smatrati pouzdanim.

IV.3. Mjerenje električkih svojstava OEPC-a

S ciljem provjere narušava li hidrogel agaroze kvalitetu naših OEPC-a, izmjerili smo električka svojstva (jednog od njih) odmah nakon evaporacije te otrpilike tjedan dana kasnije, nakon ispiranja hidrogele u kojem su rasli kvasci. Eksperimentalni postav, zajedno za shematskim prikazom, prikazan je na Slici 17. Kao kontakt za zatva-

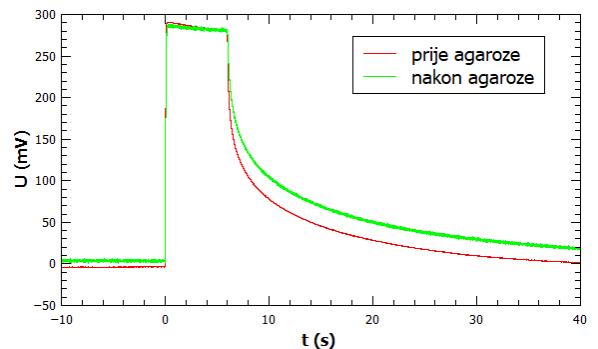


Slika 17. Eksperimentalni postav za mjerjenje strujno-naponskih karakteristika OEPC-a i njegov shematski prikaz.

ranje strujnog kruga koristimo srebrnu žicom čiji je vrh kemijski obrađen tako da čini protuelektrodu izrađenu od $AgCl$ -a. Protuelektroda je umetnuta je u odrezani vrh šprice, koja je preko plastične cjevčice spojena s drugom špricom, pomoću koje se prostor u kojem je protuelektroda ispunjava vodenom otopinom KCl -a. Pomoću pomicnog držača, vrh šprice s protuelektrodom i elektrolitom se postavlja na milimetarsku blizinu uzorku pa

se n sloj dovodi u kontakt s elektrolitom. Na evaporiрано злато се лјепи бакрена трака, која се затим спаја на позитиван пол трансимпедантног појачала. На његов негативан пол се спаја протуелектрода. Појачало је преко осцилоскопа повезано с рачуналом, путем којег билојимо податке о тремтној струji или напону струjnog круга. испод постолја на којем се налази узорак постављамо пулсирajuću diodu, тако да је њена светлост фокусирана на контакт n-sлоја и електролита.

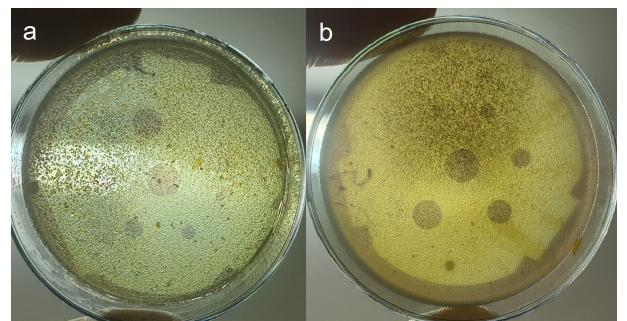
Slika 18 prikazuje grafove fotonapona stvorenih OEPC-om prije njegovog korištenja za uzgoj kvasaca i nakon. Amplituda napona prije agaroze iznosila je 289,4 mV, a nakon 286,1 mV, што је vrlo мало relativno odstupanje od 1,14%, па закљуčujemo да hidrogel agaroze не штeti našem organskom poluvodičkom foto-kondenzatoru.



Slika 18. Izmjereni fotonaponi organskog foto-kondenzatora (radijusa 3500 mm) prije njegovog korištenja za uzgoj kvasaca i nakon.

V. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati rasta optoelektronički stimuliranih kolonija kvasaca prikazani su na Slikama 19 i 20. Prilikom



Slika 19. Kolonije kvasaca nakon optoelektroničke stimulacije. Kolonije су uzgojene na hidrogelu agaroze vodljivosti $1,23 Sm^{-1}$, debljine oko 1 mm. a) Kvaci uzgojeni na površini hidrogele agaroze. b) Kvaci uzgojeni volumno u hidrogelu agaroze.

optoelektroničke stimulacije kvasaca na hidrogelu agaroze vodljivosti $1,23 \text{ Sm}^{-1}$, debljine oko 1 mm , niti za površinski niti za volumni rast kvasaca nismo uočili никакve nepravilnosti u njihovom rastu, čak niti pod mikroskopskim povećanjem (stoga te slike nisu prikazane). Za površinski uzgoj možemo reći da smo dobili rezultat u skladu s očekivanjima, jer je to područje minimalnog električnog polja. Ipak, htjeli smo se uvjeriti da standardan način uzgajanja staničnih kolonija u našem slučaju ne funkcioniра. Za volumno rasprostranjene stanice smo imali veća očekivanja. Valja reći da je u tom slučaju prilično teško mikroskopom razaznati postoje li možda nepravilnosti u donjim slojevima bližim foto-kondenzatorima. Također, naša je procjena da su stanice, iako volumno nasadene, preferirale rast na površini, što bismo mi voljeli izbjegići.

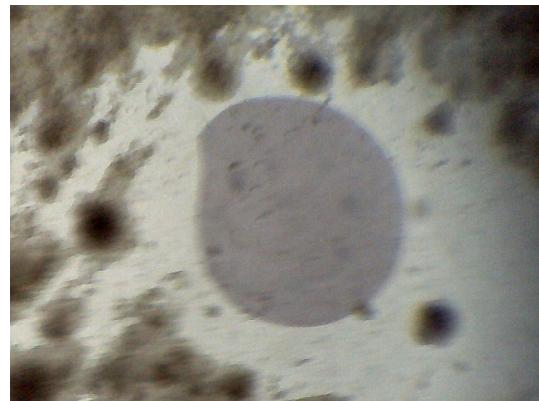


Slika 20. Kolonije kvasaca nakon optoelektroničke stimulacije. Kolonije su uzgojene na donjoj površini hidrogela agaroze vodljivosti $1,23 \text{ Sm}^{-1}$, debljine oko $0,8 \text{ mm}$. Potencijalni utjecaj foto-kondenzatora radijusa $0,5 \text{ mm}$ da sprječava rast stanica na svojoj površini, prikazan je uvećano.

U zadnjem pokušaju ovog preliminarnog eksperimenta optoelektroničke stimulacije kvasaca, korišten je hidrogel agaroze vodljivosti $0,63 \text{ Sm}^{-1}$, debljine oko $0,8 \text{ mm}$. Kako je kolonija kvasca rasla između hidrogela agaroze i foto-kondenzatora, nije se toliko dobro razvila kao u prva dva pokušaja (pretpostavljamo da je glavni razlog smanjeni dotok kisika). Stanice su narasle vrlo nehomogeno i nepravilno raspoređene (Slika 20). Ipak, primjećujemo potencijalni utjecaj najmanjeg foto-kondenzatora na rast stanica na području direktno iznad njega. Na dijelu Petrijeve zdjelice koji obuhvaća najmanji foto-kondenzator, za razliku od ostatka Petrijeve zdjelice, stanice vrlo gusto i dobro narasle, no maleno područje foto-kondenzatora ostalo je nezahvaćeno stanicama. Svjetlosnim mikroskopom, pod povećanjem od 4 puta, smo se uvjerili da iznad navedenog foto-kondenzatora stanice uistinu ne rastu (Slika 21). Valja još spomenuti da je i u ovom eksperimentu dio stanica izrastao na gornjoj površini hidrogela, koja je očigledno pogodnija za njihov rast, a što bi bilo poželjno nekako pokušati spriječiti. Bilo bi korisno posavjetovati se s biologima oko tog problema.

VI. ZAKLJUČAK

Provedena je analiza hidrogela agaroze kao bioelektričkog sučelja u svrhu omogućavanja optoelektroničke



Slika 21. Mikroskopski snimljeni slika područja nerasta stanica na površini foto-kondenzatora radijusa $0,5 \text{ mm}$.

stimulacije staničnih kolonija nedavno razvijenim organskim poluvodičkim foto-kondenzatorima. Ponašanje električnog polja u hidrogelu, koje ima ključnu ulogu u ostvarenju stimulacije, okarakterizirano je numeričkim modelom u programskom paketu *Comsol Multiphysics*. Iz modela je zaključeno kako se optimizacija hidrogela postiže smanjivanjem njegove vodljivosti i debljine, u skladu s održavanjem uvjeta za život stanica. Pokazano je i kako se za različite veličine kružnih foto-kondenzatora, očekuje mogući utjecaj na rast stanica na drugačije geometrijski određenim područjima. Nadalje, poželjno je stanice uzgajati što bliže foto-kondenzatoru, tako da se hidrogel kao izvor hrane nalazi iznad njih. U preliminarnom eksperimentu optoelektroničke stimulacije kolonija kvaščevih stanica, kontrolirano smanjenje vodljivosti hidrogela i nasadivanje stanica direktno uz foto-kondenzator pokazalo je nepotvrđeni efekt na jednom od foto-kondenzatora. Trebalo bi provesti još takvih eksperimenata sa ciljem utvrđivanja je li primjećeni efekt nastao slučajno ili s razlogom. Foto-kondenzatori se, u skladu s očekivanjima, nisu pokazali idealnom podlogom za rast stanicama, pa je i dalje otvoreno pitanje optimalnog rješenja u kojem bi stanice rasle u njihovoj neposrednoj blizini, ali uspješnije (možda dodavanje nekog pogodnog premaza). Naravno, valjalo bi promotriti kompatibilnosti drugih vrsta stanica s istim eksperimentalnim postavom. Uz to, otvoreno je područje daljnog poboljšanja numeričkog modela, u kojem su do sada, zbog kraćeg i memorijski manje zahtjevnog računa, korištene u odnosu na realnost uvećane veličine slojeva foto-kondenzatora i uvećani model stanice. Nadalje, planiramo se posvetiti prilagodbi geometrije foto-kondenzatora kako bi se postignulo jače i lokaliziranije električno polje.

-
- ¹ M. Jakešová, "Wireless bioelectronics devices driven by deep red light", doktorski rad (još neobjavljen)
- ² V. Derek, D. Rand, L. Migliaccio, Y. Hanein, E. D. Głowacki, "Untangling Photofaradaic and Photocapacitive Effects in Organic Optoelectronic Stimulation Devices", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8, Article 284, 2020
- ³ M.S. Ejneby, M. Jakešová, J. J. Ferrero, L. Migliaccio, Z. Zhao, M. Berggren, D. Khodagholy, V. Derek, J. Gelinas, E. D. Głowacki, "A chronic photocapacitor implant for noninvasive neurostimulation with deep red light" (još neobjavljen)
- ⁴ D. Rand, M. Jakešová, G. Lubin, I. Vébraitė, M. David-Pur, V. Derek, T. Cramer, N. S. Sariciftci, Y. Hanein, E. D. Głowacki, "Direct Electrical Neurostimulation with Organic Pigment Photocapacitors", *Advanced Materials*, Vol. 30, Issue 25, 1707292, 2018
- ⁵ M. Jakešová, M.S. Ejneby, V. Derek, T. Schmidt, M. Gryszel, J. Brask, R. Schindl, D. T. Simon, M. Berggren, F. Elinder, E.D. Głowacki, "Optoelectronic control of single cells using organic photocapacitors", *Science Advances*, Vol. 6, no. 4, eaav5265, 2019
- ⁶ T. F. Weiss, "Cellular Biophysics", Vol. 1, 1996
- ⁷ V. Volkov, "Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells", *Frontiers in Plant Science*, Vol. 6, Article 425, 2015
- ⁸ M. Gustin, B. Martinac, Y. Saimi, M. R. Culberston, C. Kung, "Ion channels in yeast", *Science*, Vol. 233, Issue 4769, 1986
- ⁹ S. M. Sze, M.-K. Lee, "Semiconductor Devices: Physics and Technology", Edition 3, 2012
- ¹⁰ <https://msmarmitelover.com/2011/04/how-to-make-your-own-marmite.html>
- ¹¹ K. Vulić, "Transport naboja u organskim elektrolitskim fotokondenzatorima", diplomska rad, 2020
- ¹² D. Schroder, "Semiconductor material and device characterization", 3rd edition, Chapter 1, 2006