

kelemen.lorand\_381\_25

MTA doktori értekezés tézisei

# **A kétfotonos polimerizáció fejlesztése és alkalmazása biológiai vizsgálatokban**

Kelemen Lóránd

HUN-REN Szegedi Biológia Kutatóközpont,  
Biofizikai Intézet

2025

kelemen.lorand\_381\_25

## 1. A kutatások előzményei

Mikro-elektro-mechanikai rendszerek (MEMS) a XXI. század elején a tudományos kutatások eszköztárának egy egyre elterjedtebb, megkerülhetetlen elemét alkotják, és ez a szerteágazó technológia még mindig viharos ütemben fejlődik. Számos területen alkalmazzák őket az ipartól (pl. szenzorok) az egészségügyön (mikrofluidikai diagnosztikai rendszerek) át a tudományos kutatásokig. Dolgozatom ennek a technológiának egy szeletét érinti, nevezetesen a háromdimenziós lézeres mikrofabrikációt és az ezzel előállított mikroeszközök főképp biológiai alkalmazásait. A dolgozat eredményei felölelik a technika optimalizálásának és továbbfejlesztésének néhány módját, az elkészült mikroeszközök funkcióbővítésének lehetőségeit, valamint az eszközök alkalmazását a mikromechanikában, az egyedi sejtek vizsgálatában és mikroszkópiás megfigyelésekben. Bár a technológia jellegénél fogva csak igen korlátozottan alkalmas nagy példányszámú mikroeszköz előállítására, azonban olyan speciális eszközöket adhat a kutatók kezébe, amit elsősorban azok könnyű testreszabhatóságának köszönhetően hatékonyan lehet alkalmazni egyedi sejtek vagy biológiai makromolekulák vizsgálatát célzó kutatómunkákban.

A dolgozatban bemutatott munka egy additív lézeres direkt írásos technológián, a kétfotonos polimerizáción (TPP) alapszik. A módszer az 1990-es évek elején jelent meg a mikroméretű anyagmegmunkálási eljárások között, és az évtized második felében már háromdimenziós mikroszerkezetek is készültek ezzel a technikával [1, 2]. Az SZBK Biofizikai Intézetében Ormos Pál és Galajda Péter vezette be a technológiát az ezredforduló környékén az optikai csipesszel (OT) végzett kutatásaikban vizsgált összetett alakú testek kontrollált geometriával történő gyártásához [3]. Ebből a témából nőtt ki az a kutatási irány, ami nemzetközi kooperációk révén egyrészt kapcsolódott az optikai csipesz különböző alkalmazási lehetőségeit vizsgáló nemzetközi kutatási irányokhoz, másrészt pedig a mikroeszközök egyre szélesebb körű alkalmazhatóságának vizsgálatát tűzte ki célul. A TPP-vel a 2000-es évek elején egyszerűbb struktúrákat készítettek, legtöbb esetben csak a technológia képességeinek demonstrálása volt a cél [4, 5], valós alkalmazásra alig volt példa. Az ebben az időben elkészített integrált mikromotor rendszerünkkel [T4] szintén csak egy fényel mozgatott mikromechanikai meghajtórendszer demonstrálása volt a cél. Ezt az eszközt a következő években - részben nemzetközi konzorciumokhoz kapcsolódóan – néhány további egyszerűbb mechanikai rendszer követett [T7, T9, T10].

A kétezres évek közepétől a mikrofluidika előretörésével a szakirodalomban egyre több érdekes példa volt az ilyen rendszerekben is használható passzív [6] és aktív [7] eszközre. Ekkoriban történt meg a módszer felbontásának jelentős növelése is a STED mikroszkópia elveinek felhasználásával [8]. Ezen kívül egyre elterjedtebb lett a mikroszerkezetek biológiai célú felhasználása is [9, 10]. Ebben a folyamatban úttörő módon vettünk részt, amikor bemutattuk a TPP mikroeszközök hatékony funkcionalizálását [T11], és annak első alkalmazásait az egyedi sejtek manipulációjában vagy az erősített Raman és fluoreszcenciás detektálásban [T12, T16, T17]. A következő évtizedben a technológia egyre elterjedtebb lett elsősorban a már kereskedelmi forgalomban is kapható TPP rendszereknek köszönhetően. Ekkorra már rendkívül összetett mikroméretű 3D szerkezetekkel találkozhatunk az irodalomban a mikro-optikától kezdve [11] a sejttenyésztő vázakon keresztül [12] az önálló mikrorobotokig bezárólag [13]. Az önállóan mozgatható mikroeszközök biológiai vonatkozású felhasználását mi is ebben az időszakban kezdtük tanulmányozni elsősorban azok funkcionalizált változataival [T14, T19, T20]. Ez a munka fejlődött aztán a közelmúltban odáig, hogy stabilan kézben tartjuk a deformálható mikroszerkezetek („soft microrobots”) készítését és alkalmazását elsősorban egyedi sejtek vizsgálatához [T22].

Bár a TPP-vel létrehozott mikroszerkezeteknek ipari mennyiségűre való felskálázására általunk [T1, T2] és mások által [14, 15] már voltak próbálkozások, az eszközök alkalmazásának túlnyomó részét ma még kutatólaboratóriumok falain belül találhatjuk.

## 2. Célkitűzések

A dolgozat alapjául szolgáló munka átfogó célkitűzése a polimer mikroeszközök mind szélesebb körű biológiai alkalmazásának megvalósítása. A motiváció számos esetben azt volt, hogy egy adott biológiai problémára találjak olyan megoldást mikroeszköz alkalmazásával, ami más módszerekhez képest valamilyen szempontból előnyösebb. Más esetben azonban magának a technológiának a lehetőségeit próbáltuk munkánkkal demonstrálni.

Egyik legkorábbi céлом az volt, hogy a TPP módszerét optimalizáljam és hatékonyabbá tegyem. Ezért célul tűztem ki, hogy módszert dolgozok ki a TPP párhuzamosítására, vagyis hogy egyetlen pásztázási lépés során a lézernyaláb meg többszörözésével adott idő alatt több mikroszerkezetet állítsak elő. Szintén megoldást kerestem arra a gyakori kérdésre, hogy az üveg hordozótól eltérő törésmutatójú fotopolimer anyagban hogyan lehet az üveg határfelülettől távol torzultásmentes szerkezeteket előállítani az erősen lefókuszált nyalábbal.

Mikromechanikai rendszerek egyik legérdekesebb kérdése, hogy hogyan lehet azokat hatékonyan mozgatni lehetőleg minimális külső beavatkozással. Erre a fény impulzusváltozását is felhasználhatjuk: a visszaverődés és a fénytörés során a fény impulzust ad át a mikroeszközöknek, amiktől azok mozgásba jöhetnek. Célom volt, hogy különböző mozgási módokat létrehozva (forgás, csúszás, gördülés) ezeket a meghajtási mechanizmusokat vizsgáljam. A mikromechanikai elemek mozgathatósága azt is lehetővé teszi, hogy azokat mikrofluidikai rendszerben össze lehet illeszteni. Ezért a mikromechanikai rendszerek fényvel segített összeszerelésének lehetőségeit is vizsgálataim céljává tűztem ki.

A mikroeszközök felületének bevonása jelentősen megnöveli a felhasználhatóságuk körét, ezért ennek vizsgálata kézenfekvő kutatási irány volt. Céljaim között szerepelt biológiai makromolekuláknak az SU-8 mikroszerkezetek felületéhez való kötésének optimalizálása, ezáltal téve azokat alkalmassá biológia vizsgálatokban történő használatra. A sztreptavidin volt a bevonás egyik célmolekulája, mint az egyik leggyakrabban használt fehérje a biokémiai módszerekkel aktivált felületek készítésében. Célom volt a fehérjének a mikroeszközök felületéhez specifikus és nem specifikus módon való rögzítésének kidolgozása, a felületi fehérjemennyiség tetszőleges módosítása. Természetesen céljaim között szerepelt a funkcionizált szerkezetek biológiai kísérletekben, mérésekben való alkalmazhatóságának vizsgálata is, melyek között az egyedi sejteknek a mikroszerkezetekkel való tetszőleges mozgatása kiemelt jelentőséget kapott. Fém nanorészecskék nyújtotta plazmonikus fluoreszcencia és Raman erősítésnek mozgatható szerkezetek felületén való megvalósítása a mikrofluidikai rendszerekbe integrált szenzorika egy új irányát nyithatja meg, ezért az ilyen bevonatok készítésének és alkalmazásának vizsgálatát is terveztem.

A TPP-vel létrehozott szerkezetek mérete és az azokkal, optikai csipesz segítségével elérhető erők nagysága az egyedi sejtekre jellemző méret- és erőtartományba esnek. A méretbeli egyezést kihasználva, célul tűztem ki egyedi sejtek fizikai akadályon keresztül történő áthaladásának jellemzését mikrofluidikai rendszerekbe integrált mikroszerkezetek segítségével. Az eszközökkel történő erőmérést egyrészt egyedi sejtek membránja mechanikai tulajdonságainak vizsgálatában, másrészt egyszerű polipeptidek sejt felszíni receptorokkal való kölcsönhatásának vizsgálatában terveztem felhasználni.

Megfelelően kialakított mikroeszközök alkalmasak lehetnek egyedi sejtek fénymikroszkópos megfigyelésének korábban nem kivitelezhető módokon történő megvalósítására is. Célul tűztem ki ezeknek lehetőségeknek a feltárását is, kihasználva például

a fotopolimer anyag fényvezető képességét. Megvizsgáltam, hogy alkalmas-e a technológia olyan mikro-optikai eszköz előállítására, amivel tetszőleges irányú, lokalizált fluoreszcens gerjesztést lehet megvalósítani. Kihasnálva, hogy az optikai csipessel mozgatott szerkezetekkel nem letapadó egyedi sejteket hat szabadsági fokkal lehet mozgatni, célul tűztem ki a sejtek fluoreszcens képalkotásának javítását többnézetű mikroszkópiával. Végül pedig azt kívántam bemutatni, hogy megfelelően kiválasztott polimerből lehetséges a sejtek mikroszkópos megfigyelés közbeni mozgatására alkalmas rugalmas mikroeszközöket készíteni, ahol a sejtek szerkezetéhez rögzítése csupán azok rugalmasságával, a sejtek és a szerkezetek kezelése nélkül elérhető.

### 3. Kísérleti módszerek

#### Polimer mikroeszközök készítése és funkcionalizálása

A dolgozatban bemutatott polimer mikroeszközök kétfotonos polimerizációval (TPP) készültek. A TPP egy lézeres additív mikrofábrrikációs technika, a lézeres direkt írások (DLW) csoportjába sorolható. A TPP során egy ultrarövid impulzusú lézer fényét egy többnyire nagy numerikus apertúrájú objektívvel fókuszáljuk fényérzékeny polimerbe, aminek hatására kétfotonos abszorpció révén a fókusz környezetében megtörténik a polimerizáció. A mintát és a fókuszot egymáshoz képest mozgatva a polimerizációt bármilyen háromdimenziós útvonal mentén elő lehet idézni. A TPP-vel egyetlen megvilágítási lépéssel tetszőleges alakú 3D polimer mikroeszközök hozhatók létre maximálisan néhány száz mikrométeres méretben és kb. száz nanométeres részletekkel. A módszert széles körben alkalmazzák mikrofluidikai, mikrooptikai alkatrészek, de akár orvosi mikroeszközök előállítására is.

A disszertációban bemutatott munkáim során kétféle fotopolimerrel dolgoztam: SU-8-cal, és OrmoComppal. Az SU-8 egy epoxi alapú fotopolimer, ami a műanyagok között kis rugalmassággal (Young-modulus 4-5 GPa) és viszonylag nagy hőtűréssel (folyási hőmérséklet kb. 200 C°), valamint nagyfokú kémiai semlegességgel rendelkezik. A másik fotopolimer az OrmoComp, amely az Ormocerek („Organically modified ceramics”, szerves anyagokkal módosított kerámia) családjába tartozik. Az OrmoComp Young-modulusa a fotopolimerek között viszonylag kicsi (a tömbi anyagé 1 GPA körüli), méréseik szerint pedig mikrométernél vékonyabb szálai az optikai csipessel elérhető pN-os erőkkkel már deformálhatóvá válhatnak.

A polimerizáló rendszerünk házi építésű, és az elmúlt két évtizedben folyamatos fejlesztésen esett át. A fényforrása jelenleg egy ultrarövid impulzusú szállezer maximálisan

120 mW átlagos teljesítménnyel és 150 fs impulzushosszal. A fókuszáló objektívünk egy Zeiss C PlanApo mikroszkóp objektív 40x nagyítással és 1.2 numerikus apertúrával. A minta mozgatását egy három tengely mentén, nanométeres pontossággal mozgatható piezo asztal végzi. Az egyes elemek összehangolt működtetéséért egy LabView környezetben, általunk fejlesztett szoftver felelős. Ezzel a rendszerrel minimálisan kb. 200 nm vastag polimer szálát tudunk készíteni.

A dolgozatban bemutatott munkák nagy részéhez szükséges volt, hogy az SU-8 polimer mikroeszközök felületét valamilyen fizikai vagy kémiai módszerrel módosítsam, bevonjam (funkcionalizálás). A kémiai kapcsolatok kiindulópontjai ehhez a polimer kötések kialakításában is résztvevő, de még el nem reagált felületi epoxi csoportok voltak. A bevonás első lépése minden esetben az epoxi csoportok felszakítása volt egy savas kezeléssel, amit egy összekötő (többnyire polietilén-glikol alapú) molekulának kovalens módon az így létrejött kémiai csoporthoz való kötése követett. Ehhez kapcsoltuk aztán az aktív funkciót ellátó molekulát, ami lehetett egy egyszerűbb molekula (pl. biotin, glutation), de akár fehérje (pl. streptavidin) is. Ezen kívül bizonyos kísérletekhez a szerkezeteink felületét szerves anyagokkal, ezüst és arany nanorészecskékkel is funkcionizáltuk. Ezeket a bevonásokat vagy a PEG láncvégek és az előre elkészített nanorészecskék között kialakuló elektrosztatikus vonzás révén értük el, vagy egyenesen a felületen hoztuk létre a nanorészecskéket. Az OrmoComp szerkezetek funkcionizálásának a kidolgozása jelenleg van folyamatban.

## Optikai csipesz

Számos bemutatott munka azon alapult, hogy a mikroeszközöket nagy pontossággal tudjuk tetszőleges irányba eltolni és forgatni. Ezekhez a mozgásokhoz optikai csipeszt használtam. Az optikai csipeszt egy lefókuszált lézernyaláb hozza létre, amivel a mikrométer nagyságrendjébe eső testek helyzetét lehet a fókuszban rögzíteni. A jelenség alapja, hogy a csapdázott test fénytörés révén megváltoztatja a fény terjedésének irányát és ezzel impulzusát. A fókuszba kerülő testet az intenzitás gradiensevel arányos és a növekvő intenzitás felé mutató ún. gradiens erő tartja ott, ahol aztán az eredetileg Brown-mozgást végző test egy harmonikus potenciálvölgyben erősen csillapított fluktuációt végez. A fluktuáció félértékszélessége az alkalmazott lézerteljesítménytől és optikától függően akár néhány nanométerre is csökkenthető. Az optikai csipesz erőmérésre a fN-pN-os tartományban, távolságmérésre a nm-es tartományban alkalmas.

A fókuszpontot elmozdítva a csapdázott testek követik ezt a mozgást. Alkalmos optikai elemek segítségével az eredetileg egyetlen nyalábot meg is lehet többszörözni, vagyis a mintatérben több csapdázó fókuszpontot létrehozni. Én ezt egy térbeli fázismodulátor (SLM) segítségével értem el, amivel egy holografikus optikai csipeszt (HOT) építettünk. A HOT arra is alkalmas, hogy a megtöbbszörözött fókuszpontokat a nyalábok irányának és divergenciájának módosításával a mintatérben egymástól függetlenül tetszőleges irányba mozgassa. Így a lézercsipesz rendszerünkkel az összetett alakú polimer mikroeszközöket több pontot megragadva, azokat stabilan, 100 nm nagyságrendű fluktuációval lehetett tartani a mintában, illetve tetszőlegesen, hat szabadsági fokkal mozgatni.

A lézercsipesz rendszerünk szintén házi építésű, és egy Nikon Eclipse Ti fluoreszcens mikroszkóphoz van hozzáépítve. A fényforrása egy folytonos üzemű szállezer, ami 1070 nm hullámhosszon világít, maximálisan 10 W teljesítménnyel. Az SLM által módosított csapdázó nyalábokat egy 60x-os nagyítású, 1.2-es numerikus apertúrájú Olympus vízimmerziós objektív fókuszálta a mintába. A mikroszkópban széles látóterű fluoreszcens megfigyeléssel egyidejűleg lehetett mozgatni az optikai csipesszel a mikroszerkezeteket. A megfigyeléseket egy nagy érzékenységgű CMOS kamerával rögzítettük. A csapdákat saját fejlesztésű szoftverrel mozgattuk.

## 4. Új tudományos eredmények

### **A TPP módszerének optimalizálása diffrakciós optikai elemekkel**

1. Diffraktív optikai elemek felhasználásával eljárást dolgoztam ki a kétfotonos polimerizáció párhuzamosítására, amivel jelentősen gyorsabban készíthetők összetett polimer mikroszerkezetek. A hatékonyságot az eredetileg egyetlen polimerizáló lézernyaláb megtöbbszörözésével sikerült növelnem, amelynek segítségével az összetett szerkezeteket több pásztázási lépés helyett egyetlen pásztázással el lehetett készíteni. A módszert demonstráltam állandó és változtatható diffrakciós mintázatot létrehozó optikai elemmel is. Megmutattam, hogy a szerkezetek geometriája a módszerrel kontrollált módon változtatható. [T1]

2. Megmutattam, hogy az SLM-nek, mint a TPP párhuzamosításában használt diffraktív optikai elemnek a gyártási tökéletlenség miatti felszíni görbülete megfelelő fázistolás mintázattal kompenzálható. Meghatároztam az SLM felszínének a görbületét, aminek ismeretében kiszámoltam a polimerizációhoz használt 785 nm hullámhosszhoz alkalmas korrekciós hologramot, és igazoltam, hogy azt alkalmazva az SLM felületét jó közelítéssel

síkhullám hagyja el. Megmutattam, hogy a korrekció a tér mindhárom irányában megszünteti a TPP-vel készített szerkezetek deformitását. [T2]

3. A hordozótól eltérő törésmutatójú, vastag polimer rétegbe történő fókuszálás miatt előálló fókuszeltolódás és fókuszolt torzulás kompenzálását valósítottam meg a kétfotonos polimerizációs eljárásban. A fókuszálás során fellépő szférikus aberráció javításához az SLM-mel előkompenzáltam a nyalábot egy, az aberrációval ellentétes fázistolást létrehozó korrekciós hologrammal. A több, mint 10%-os fókuszeltolódást 2.5%-ra csökkentettem, és teszt szerkezetekkel megmutattam, hogy azok geometriája is nagymértékben független lett attól, hogy milyen vastag polimer rétegen keresztül világítva készültek. [T3]

### **Fénnyel hajtott mikromechanikai rendszerek**

4. A fény impulzusát fényvisszaverődés révén forgó és haladó mozgássá alakító mikromechanikai rendszereket készítettem és vizsgáltam mozgásukat. Az üveg hordozóhoz rögzített tengellyel rendelkező mikromotort egy, a vele közös hordozóra polimerizált fényvezető szálból kilépő fény hajtotta meg, a fényintenzitástól függő fordulatszámmal. Két módszerrel meghatároztam a fény által a motornak átadott impulzusnyomatékot, melyek jó egyezést adtak. Az integrált motor mikromechanikai rendszerek erőforrásaként használható fel. Megmutattam, hogy fényvezető mikroszerkezetbe becsatolt, és azon áthaladó fény a terjedés irányának megváltozása miatt erőt fejt ki a szerkezetre, és mozgásba hozza. [T4, T5, T6]

5. Autonóm módon mozgó, fénnyel hajtott mikrométeres testek mozgásának tanulmányozásához készítettem polimer eszközöket. Sík felületen a sík normálisa irányából homogén módon megvilágított szerkezetek egyedül alakjuk és helyzetük által meghatározott irányban mozogtak. Az autonóm mozgást egy ék alakú, a felületen csúszó, és egy hengeres burkolóval rendelkező, a felületen gördülő testtel demonstráltuk. A hengeres testek esetében megmutattuk, hogy folyamatos gördülés homogén megvilágítás mellett csak akkor jöhet létre, ha a henger tengelyére merőlegesen beeső fénynek – a testről való visszaverődés után – van a tengellyel párhuzamos komponense is. [T7, T8]

6. Mikromechanikai elemek optikai csipesszel történő két- és háromdimenziós összeszerelését demonstráltam alak-komplementer mikroszerkezetekkel. A kétdimenziós összeszereléshez olyan síkbeli alakzatot készítettem, amit két optikai csipesszel lehet mozgatni, és amivel egy sík felületet teljesen le lehet fedni. Az összeszerelést különböző mértékben automatizált eljárásokkal is megmutattam. A háromdimenziós mozgást igénylő

összeszereléshez kétféle, egymásba illeszkedő alakot készítettem. Megmutattam, hogy megfelelő alakú alkatrészekkel mikroméretekben is lehetséges olyan összeszerelés, ahol az alkatrészek az összeillesztés után egyben maradnak. [T9, T10]

### **Mikroszerkezetek felületkezeléses funkciónövelése**

7. Eljárásokat dolgoztam ki az epoxi-alapú SU8 fotopolimer felületének specifikus és nem specifikus módon, fehérjével történő bevonására. A polimer felülethez való kötés alapja minden esetben a felületi epoxi gyűrűk felszakítása volt, amit egy összekötő molekula alkalmazása követett, majd ehhez kapcsolódott a fehérjét megkötő molekula. A felületek specifikus bevonását sztreptavidin fehérjével demonstráltam. A nem specifikus bevonás során glutáraldehidet alkalmaztam fehérjét megkötő molekulaként. Megmutattam, hogy PEG összekötő molekulával a specifikus esetben közel tízszer nagyobb felületi fehérje koncentrációt lehet elérni, mint a szilán alapúval, illetve mint a nem specifikus bevonással. [T11, T12]

8. Eljárást dolgoztam ki nem letapadó egyedi sejtek fehérjével bevont mikroeszközökkel történő indirekt optikai manipulációjára. Az eljárás során az optikai csipesszel megfogott szerkezetet biokémiai úton a sejthez kell tapasztani, és ezt követően lehet azt a szerkezet segítségével a csipesszel mozgatni, elkerülve a sejt közvetlen megvilágítását a csapdázó fényvel. A módszer egyik megvalósításában a mikroeszközöket sztreptavidinnel vontam be, és a sejteket azok membránjához kötött biotin segítségével kapcsoltam hozzájuk. A másik megvalósításban a mikroszerkezeteket konkanavalin A fehérjével vontam be, és így a sejteket kezelés nélkül lehet a szerkezetekhez tapasztani. Megmutattam, hogy a sejtek hat szabadsági fokú mozgatása megbízható módon kivitelezhető a szerkezet olyan kialakításával, amikor a csapdázott sejt a csapdapozíciók alkotta síktól távol esik. Ugyanilyen mikroeszköz 15  $\mu\text{m}$  átmérőjű egyedi sejtet olyan kis fluktuációval képes egyhelyben tartani, ami alkalmassá teszi optikai képalkotásban való alkalmazásra. [T13, T14]

9. Suttogó galéria elven működő fehérje érzékelőt készítettem közvetlenül mikrofluidikai csatornába történő kétfotonos polimerizációval. A detektor egy rezonátor korongból és a mellé integrált fényvezető szálból áll, melynek kritikus geometriai paramétereit (rezonátor átmérő és rezonátor-fényvezető távolság) optimalizáltam. Az érzékelő a mikrofluidikai csatornában áramló folyadékban mutatja ki a kívánt fehérje jelenlétét. A fehérjeérzékelést a detektor rezonátor korongjának a funkcionálásával értem el. A működést sztreptavidin fehérje kimutatásával demonstráltam. [T15]

10. Fluoreszcencia illetve Raman szórás erősítésére alkalmas, optikai csipessel mozgatható mikroeszközöket készítettem SU8 fotopolimer mikroszerkezetek arany és ezüst nanorészecskékkel történő bevonásával. Arany nanorészecskékkel bevont rétegekkel maximálisan 5-szörös fluoreszcencia erősítést értem el, aminek a legkisebb kiterjedése körülbelül  $1 \mu\text{m}^2$  volt. Megállapítottam, hogy a fluoreszcencia erősítés eredete a beérkező és az arany nanorészecske rétegről visszaverődő nyalábok interferenciája. A Raman erősítést ezüst nanorészecskékkel lokálisan bevont és optikai csipessel mozgatható mikroeszközökkel valósítottam meg. Megállapítottam, hogy erősítés csak a szerkezetek bevonattal rendelkező részén jön létre, mértéke pedig függ a nanorészecskék méretétől és felületi sűrűségétől. [T16, T17]

### **Egyedi sejtek jellemzése polimer mikroeszközökkel**

11. Rákos sejtek szűk fizikai akadályokon való átjutásának vizsgálatát lehetővé tevő, szub-mikrométeres szélességű nyílásokkal rendelkező gátrendszert, mint az áttétképződés egy modelljét készítettem el mikrofluidikai rendszerben. A gát struktúrát közvetlenül a mikrofluidikai csatornába polimerizáltam, ami ott két folyadék részt választott el. Az eszköz segítségével megállapítottuk, hogy a rákos sejtek akár részekre szakadás árán is képesek átjutni a szűk fizikai akadályon, majd a másik oldalon ismét egyesülnek. [T18]

12. Egyedi sejtek mechanikai vizsgálatára alkalmas, optikai csipessel mozgatható polimer mikroeszközt készítettem és alkalmaztam. Az eszközzel egy újszerű mérési elrendezésben mértem meg endotél sejtek membránjának Young-modulusát, ismert erővel benyomódásokat váltva ki a sejtek membránján. A kapott eredmények megbízhatóságát az irodalomban található rugalmasság értékekkel és kísérleti paramétereiktől való függésekkel történő jó egyezés mutatja. A módszer alkalmas az atomerő mikroszkóppal elérhető kísérleti paramétertartomány kiterjesztésére. [T19]

13. Optikai csipessel mozgatható, funkcionizált mikroeszközökkel elsőként vizsgáltam a gyógyszerbejuttatásra alkalmas nanorészecskék hatékonyságát növelő anyagnak, a glutationnak endotél sejtekhez való tapadásához szükséges erőt. A tapadás valószínűségét vizsgálva azt találtam, hogy a glutation nélküli szerkezetek szinte sohasem tapadtak a sejtekhez. A polimer mikroeszközt optikai csipessel a sejtekhez nyomva, majd elhúzva mértem meg az elszakadáshoz szükséges erőt. Azt találtam, hogy a glutationnal bevont esetben a tapadás ereje szignifikánsan, kb. 3-8-szor magasabb volt, mint a bevonat nélküliben. Az

eredményeket atomerő mikroszkópos mérésekkel hasonlítottam össze, ami megfelelő egyezést adott. [T20]

### **Mikroszerkezetek alkalmazása egyedi sejtek mikroszkópos megfigyelésében**

14. Optikai csipesszel mozgatható fényvezető szálat készítettem lokalizált, többirányú fluoreszcens gerjesztés megvalósításához. A mobil egymódusú szállal a gerjesztést bármely, az optikai tengelyre merőleges irányban meg lehet valósítani. Megmutattam, hogy az eszközzel a gerjesztést lokalizálni lehet egy kb.  $1 \mu\text{m}^2$ -es területre. A szál görbületi sugarának megfelelő megválasztásával, a szerkezet kompakt méretét megtartva, minimalizáltam a fény irányváltozása miatti veszteséget. [T21]

15. Az egyedi sejtek indirekt optikai manipulációjának módszerét felhasználtam a széles látóterű fluoreszcens mikroszkópos képalkotás felbontásának javítására. Ehhez a többnézetű mikroszkópiát alkalmaztam, amiben a sejt 3D felvételének a különböző irányokból történő rögzítéséhez szükséges sejtmozgatást és forgatást az optikai csipesszel valósítottam meg. A szakirodalomban található képfeldolgozó eljárásokat adaptáltam az optikai csipesszel segített felvételek kiértékeléséhez. Megmutattam, hogy módszerünkkel lehetséges az optikai tengely irányú felbontás körülbelül 2.4-szeres javítása, ami közel izotróp felbontást eredményez. [T14]

16. Rugalmas, optikai csipesszel deformálható mikroszerkezetekkel demonstráltam egyedi, nem letapadó sejtek indirekt optikai manipulációját. Az eljárás legfontosabb jellemzője, hogy a sejtmozgatáshoz nem szükséges a sejteket a szerkezetekhez tapasztani, azokat egyedül a szerkezet rugalmassága tartja együtt, és a megragadott sejtek tetszőlegesen el is engedhetők. A módszerhez a polimerizációs paraméterek optimalizálásával olyan, szub-mikrométeres keresztmetszetű polimer szálakat állítottam elő, amelyeket az optikai csipesz 60 pN-nál kisebb erővel deformálni képes. A szálakat jellemeztem és meghatároztam Young-modulusukat. A szálakat megfelelően kialakított szerkezetbe integrálva, sejtmanipulációs feladatok elvégzésére alkalmas mikroeszközöket készítettem. A módszerrel demonstráltam egyedi sejtek előre megadott területre való összegyűjtését, egyedi sejtről többnézetű mikroszkópiával történő felvételek készítését, valamint időben és térben kontrollált sejt-sejt kölcsönhatás megvalósítását. [T22]

## 5. Eredmények hasznosítása

A disszertációban bemutatott polimer mikroeszközök jelentős része valamilyen tudományos probléma vizsgálatára alkalmas, emiatt a mikroszerkezetek alapvetően kutatási eszközök. Ipari méretű alkalmazásukat elsősorban gyártásuk felskálázása kell, hogy megelőzze, és a TPP módszerének bemutatott párhuzamosítása SLM-mel egy lépés lehet ebben az irányban. A suttogó galéria elvén alapuló fehérje detektáló rendszer geometriai optimalizálás után alkalmas lehet összetettebb mikrofluidikai rendszerbe történő beépítésre és diagnosztikai feladatok ellátására, pl. egy adott fehérje kimutatására. Az áramoltatást nem igénylő mikrofluidikai rendszere és a tisztán optikai elven történő detektálás viszonylag egyszerű alkalmazhatóságot eredményezhet (minta egyszerű betöltése, kiolvasás). A vastag fotopolimer rétegbe való polimerizálás optikai korrekciója és a holografikusan megnövelt határfokú polimerizáló rendszerben használatos SLM felületi görbületének korrekciója, két olyan eredmény, ami a bemutatott formában alkalmas akár kereskedelmi TPP rendszerek precizitásának javítására is. A fényel hajtott mikromechanikai eszközök kisebb összetett rendszerek meghajtására lehetnek alkalmasak a fény impulzusának kontrollált módon mechanikai mozgássá való átalakítása révén. Az autonóm módon mozgó eszközeink számának az adott mintatérben való megnövelése alkalmas lehet a kollektív mozgás mikroméreteken való tanulmányozására azzal a szabadsággal, hogy az egyes elemek alakját tetszőlegesen meg lehet választani.

A mikroeszközök felületének viszonylag egyszerű funkcionálizálása akár fém nanorészecskékkel, akár biológiai makromolekulákkal sok lehetőséget hordoz alkalmazhatóságukat tekintve. A sejtek vizsgálatát segítő funkcionálizált mikroeszközöket együttműködések keretében a jövőben is alkalmazni kívánjuk felfedező kutatások során különböző makromolekuláknak, polipeptideknek biológiai gátrendszereket alkotó sejtek felszínéhez való kötése erősségének vizsgálatához fiziológiás és patológiás modellekben. Ezeket az eljárásokat folyamatosan fejlesztjük, ahol a cél a pontosabb és nagyobb mennyiségű mérés elvégzése.

A deformálható mikroeszközöket egyelőre szintén alapkutatási eszközöknek tekintjük, de ezek mutatják jelenleg a legnagyobb potenciált akár egyedi sejtek vizsgálatára, de mikroreológiai vagy fotonikai kutatásokban való alkalmazásra is. Jelenleg két kutatócsoporttal állunk együttműködésben ezekben a témákban. Biológiai rendszerekhez tervezett mikroszerkezetekkel szerzett tapasztalataink, és a módszer tervezett párhuzamosítása segíteni

## kelemen.lorand\_381\_25

fognak abban, hogy a jövőben az egyedi sejteket érintő kérdésre hatékony vizsgálati módszereket tudjunk ajánlani.

## A tézispontokhoz kapcsolódó tudományos közlemények

- T1. **Kelemen, L.**, S. Valkai, and P. Ormos, *Parallel photopolymerisation with complex light patterns generated by diffractive optical elements*. Optics Express, 2007. **15**(22): p. 14488-14497.
- T2. **Kelemen, L.**, P. Ormos, and G. Vizsnyiczai, *Two-photon polymerization with optimized spatial light modulator*. J. Eur. Opt. Soc.-Rapid Publ., 2011. **6**: p. 11029.
- T3. Horváth, B., P. Ormos, and **L. Kelemen**, *Nearly aberration-free multiphoton polymerization into thick photoresist layers*. Micromachines, 2017. **8**(7): p. 219.
- T4. **Kelemen, L.**, S. Valkai, and P. Ormos, *Integrated optical motor*. Applied Optics, 2006. **45**(12): p. 2777-2780.
- T5. Metzger, N.K., M. Mazilu, **L. Kelemen**, P. Ormos, and K. Dholakia, *Observation and simulation of an optically driven micromotor*. Journal of Optics, 2011. **13**(4): p. 044018.
- T6. Palima, D., A.R. Banas, G. Vizsnyiczai, **L. Kelemen**, T. Aabo, P. Ormos, and J. Gluckstad, *Optical forces through guided light deflections*. Optics Express, 2013. **21**(1): p. 581-593.
- T7. Búzás, A., **L. Kelemen**, A. Mathesz, L. Oroszi, G. Vizsnyiczai, T. Vicsek, and P. Ormos, *Light sailboats: Laser driven autonomous microrobots*. Applied Physics Letters, 2012. **101**(4): p. 041111.
- T8. Oroszi, L., A. Búzás, P. Galajda, **L. Kelemen**, A. Mathesz, T. Vicsek, G. Vizsnyiczai, and P. Ormos, *Dimensionality constraints of light-induced rotation*. Applied Physics Letters, 2015. **107**(20): p. 204106.
- T9. Rodrigo, P.J., **L. Kelemen**, C.A. Alonzo, I.R. Perch-Nielsen, J.S. Dam, P. Ormos, and J. Gluckstad, *2D optical manipulation and assembly of shape complementary planar microstructures*. Optics Express, 2007. **15**(14): p. 9009-9014.
- T10. Rodrigo, P.J., **L. Kelemen**, D. Palima, C.A. Alonzo, P. Ormos, and J. Gluckstad, *Optical microassembly platform for constructing reconfigurable microenvironments for biomedical studies*. Optics Express, 2009. **17**(8): p. 6578-6583.
- T11. Aekbote, B.L., J. Jacak, G.J. Schutz, E. Csanyi, Z. Szegletes, P. Ormos, and **L. Kelemen**, *Aminosilane-based functionalization of two-photon polymerized 3D SU-8 microstructures*. European Polymer Journal, 2012. **48**(10): p. 1745-1754.
- T12. Aekbote, B.L., T. Fekete, J. Jacak, G. Vizsnyiczai, P. Ormos, and **L. Kelemen**, *Surface-modified complex SU-8 microstructures for indirect optical manipulation of single cells*. Biomedical Optics Express, 2016. **7**(1): p. 45-56.
- T13. Vizsnyiczai, G., B.L. Aekbote, A. Buzas, I. Grexa, P. Ormos, and **L. Kelemen**, *High accuracy indirect optical manipulation of live cells with functionalized microtools*, in Optical Trapping and Optical Micromanipulation Xiii, K. Dholakia and G.C. Spalding, Editors. 2016, SPIE: Bellingham, WA. p. 992216.
- T14. Vizsnyiczai, G., A. Búzás, B. Lakshmanrao Aekbote, T. Fekete, I. Grexa, P. Ormos, and **L. Kelemen**, *Multiview microscopy of single cells through microstructure-based indirect optical manipulation*. Biomedical Optics Express, 2020. **11**(2): p. 945-962.

- T15. **Kelemen, L.**, E. Lepera, B. Horváth, P. Ormos, R. Osellame, and R. Martínez Vázquez, *Direct writing of optical microresonators in a lab-on-a-chip for label-free biosensing*. Lab on a Chip, 2019. **19**(11): p. 1985-1990.
- T16. Aekbote, B.L., F. Schubert, P. Ormos, and **L. Kelemen**, *Gold nanoparticle-mediated fluorescence enhancement by two-photon polymerized 3D microstructures*. Optical Materials, 2014. **38**: p. 301-309.
- T17. Vizsnyiczai, G., T. Lestyán, J. Joniova, B.L. Aekbote, A. Strejckova, P. Ormos, P. Miskovsky, **L. Kelemen**, and G. Bano, *Optically trapped surface-enhanced Raman probes prepared by silver photoreduction to 3D microstructures*. Langmuir, 2015. **31**(36): p. 10087-10093.
- T18. Sima, F., H. Kawano, A. Miyawaki, **L. Kelemen**, P. Ormos, D. Wu, J. Xu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, *3D biomimetic chips for cancer cell migration in nanometer-sized spaces using “Ship-in-a-Bottle” femtosecond laser processing*. ACS Applied Bio Materials, 2018. **1**(5): p. 1667-1676.
- T19. Grexa, I., T. Fekete, J. Molnár, K. Molnár, G. Vizsnyiczai, P. Ormos, and **L. Kelemen**, *Single-cell elasticity measurement with an optically actuated microrobot*. Micromachines, 2020. **11**(9): p. 882.
- T20. Fekete, T., M. Mészáros, Z. Szegletes, G. Vizsnyiczai, L. Zimányi, M.A. Deli, S. Veszeka, and **L. Kelemen**, *Optically manipulated microtools to measure adhesion of the nanoparticle-targeting ligand glutathione to brain endothelial cells*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021. **13**(33): p. 39018-39029.
- T21. Palima, D., A.R. Banas, G. Vizsnyiczai, **L. Kelemen**, P. Ormos, and J. Gluckstad, *Wave-guided optical waveguides*. Optics Express, 2012. **20**(3): p. 2004-2014.
- T22. Iványi, G.T., B. Nemes, I. Gróf, T. Fekete, J. Kubacková, Z. Tomori, G. Bánó, G. Vizsnyiczai, and **L. Kelemen**, *Optically actuated soft microrobot family for single-cell manipulation*. Advanced Materials, 2024. **36**(32): p. 2401115.

## Irodalomjegyzék

1. Maruo, S., O. Nakamura, and S. Kawata, *Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization*. Optics Letters, 1997. **22**(2): p. 132-134.
2. Wu, E.-S., et al., *Two-photon lithography for microelectronic application*. Microlithography '92. Vol. 1674. 1992: SPIE.
3. Galajda, P. and P. Ormos, *Complex micromachines produced and driven by light*. Applied Physics Letters, 2001. **78**(2): p. 249-251.
4. Maruo, S., K. Ikuta, and H. Korogi, *Force-controllable, optically driven micromachines fabricated by single-step two-photon micro stereolithography*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2003. **12**(5): p. 533-539.
5. Tanaka, T., H.-B. Sun, and S. Kawata, *Rapid sub-diffraction-limit laser micro/nanoprocessing in a threshold material system*. Applied Physics Letters, 2002. **80**(2): p. 312-314.
6. Amato, L., et al., *Integrated three-dimensional filter separates nanoscale from microscale elements in a microfluidic chip*. Lab on a Chip, 2012. **12**(6): p. 1135-1142.
7. Maruo, S. and H. Inoue, *Optically driven micropump produced by three-dimensional two-photon microfabrication*. Applied Physics Letters, 2006. **89**(14): p. 144101.
8. Fischer, J., G. von Freymann, and M. Wegener, *The Materials Challenge in Diffraction-Unlimited Direct-Laser-Writing Optical Lithography*. Advanced Materials, 2010. **22**(32): p. 3578-3582.
9. Klein, F., et al., *Elastic Fully Three-dimensional Microstructure Scaffolds for Cell Force Measurements*. Advanced Materials, 2010. **22**(8): p. 868-871.
10. Ovsianikov, A., et al., *Rapid prototyping of ossicular replacement prostheses*. Applied Surface Science, 2007. **253**(15): p. 6603-6607.
11. Wang, H., et al., *Two-Photon Polymerization Lithography for Optics and Photonics: Fundamentals, Materials, Technologies, and Applications*. Advanced Functional Materials, 2023. **33**(39): p. 2214211.
12. Wang, W., et al., *Two-photon polymerization-based 3D micro-scaffolds toward biomedical devices*. Chemical Engineering Journal, 2024. **493**: p. 152469.
13. Rajabasadi, F., et al., *3D and 4D lithography of untethered microrobots*. Progress in Materials Science, 2021. **120**: p. 100808.
14. Maibohm, C., et al., *Multi-beam two-photon polymerization for fast large area 3D periodic structure fabrication for bioapplications*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 8740.
15. Ricci, D., et al., *Scaling-Up Techniques for the Nanofabrication of Cell Culture Substrates via Two-Photon Polymerization for Industrial-Scale Expansion of Stem Cells*. Materials, 2017. **10**(1): p. 66.