kelemen.lorand_381_25

MTA doktori értekezés

A kétfotonos polimerizáció fejlesztése és alkalmazása biológiai vizsgálatokban

Kelemen Lóránd

HUN-REN Szegedi Biológia Kutatóközpont

Biofizikai Intézet

2025

kelemen.lorand_381_25

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés 1
2. Irodalmi áttekintés 4
2.1. A kétfotonos polimerizáció (TPP) 4
2.1.1. A TPP módszere 4
2.1.2. A TPP párhuzamosítása 11
2.1.3. A TPP módszer fejlesztésének további irányai 12
2.2. A PME-k funkcionalizálása 14
2.3. Az optikai csipesz, mint a PME-k mozgatásának egyik módja 16
2.4. Példák a PME-k alkalmazásaira 19
3. Kísérleti eszközök 22
3.1. A kétfotonos polimerizáló rendszerünk felépítése 22
3.2. Az optikai csipesz rendszer 24
Tudományos eredményeim bemutatása 26
4. A TPP módszerének optimalizálása diffrakciós optikai elemekkel 27
4.1. A TPP módszerének párhuzamosítása 27
4.2. Korrekció vastag SU-8 rétegbe való polimerizáció esetén 32
4.3. Összegzés 35
5. Fénnyel hajtott mikromechanikai rendszerek. 37
5.1. Fényvisszaverődéssel mozgatott mikroszerkezetek 37
5.1.1. Felületre integrált optikai motor 37
5.1.2. Mozgatás mikroszerkezetbe csatolt fénnyel 41
5.1.3. Autonóm mozgó mikroszerkezet I: csúszó ék 42
5.1.4. Autonóm mozgó mikroszerkezet II: gördülő henger 44
5.2. Optikai csipesz alkalmazása mikroméretű alkatrészek összeszerelésére 47
5.3. Összegzés 51

6. Mikroszerkezetek felületkezeléses funkciónövelése 53
6.1. SU-8 mikroszerkezetek bevonása fehérjével 54
6.2. Egyedi sejt optikai manipulációja funkcionalizált mikroszerkezetekkel 58
6.3. WGM detektor készítése fehérje jelölésmentes érzékeléséhez 62
6.4. Lokális fluoreszcencia erősítés aranyozott polimer mikroszerkezetekkel 68
6.5. Mobil mikroeszköz felületerősített Raman spektroszkópiához 74
6.6. Összegzés 77
7. Egyedi sejtek jellemzése polimer mikroeszközökkel 79
7.1. Sejtmigráció vizsgálata mikrocsatornákkal 79
7.2. Egyedi endotél sejtek rugalmasságának mérése 83
7.3. Nanorészecske bejuttatást segítő molekulák endotél sejtekhez tapadása 88
7.4. Összegzés 93
8. Mikroszerkezetek alkalmazása egyedi sejtek mikroszkópos megfigyelésében 94
8.1. Egyedi sejtek többirányú, lokális fluoreszcens gerjesztése 94
8.2. Optikai mikroszkóp felbontásának javítása indirekt mikromanipulációval 98
8.2.1. Egyedi sejtek 6 szabadsági fokú mozgatása 99
8.2.2. Többnézetű mikroszkópia 100
8.3. Sejtmanipuláció rugalmas mikrorobotokkal 107
8.3.1. Sejtgyűjtő mikroeszköz 111
8.3.2. Sejtcsipesz mikroszkópos megfigyeléshez 112
8.3.3. Sejt-sejt kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas szerkezet 114
8.4. Összegzés 118
9. Összefoglalás és tervek 120
Köszönetnyilvánítás 122
Irodalomjegyzék 124

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADA	akceptor-donor-akceptor	
AFM	atomerő mikroszkóp	(Atomic Force Microscope)
AgNP	ezüst nanorészecske	
AOM	akuszto-optikai modulátor	(Acousto-optic modulator)
APTES	3-aminopropil(trietoxi)szilán	
APTMS	3-aminopropil(trimetoxi)szilán	
AuNP	arany nanorészecske	
BBB	vér-agy gát	(Blood-Brain Barrier)
BSA	szarvasmarha szérumalbumin	(Bovine Serum Albumin)
CAN	ammónium-cérium(IV)-nitrát	
CCD	töltéscsatolt, vagy CCD kamera	(Charge-Coupled Device)
CMOS	CMOS kamera	(Complementary Metal-Oxide Semiconductor)
ConA	konkavalin-A fehérje	
CY3	cianin 3 fluoreszcens festék	
CY5	cianin 5 fluoreszcens festék	
DA	donor-akceptor	
DAD	donor-akceptor-donor	
DLW	lézeres direkt írás	(Direct Laser Writing)
DNS	dezoxiribonuklensav	
EDA	etiléndiamin	
EGF	epidermális növekedési faktor	(Epidermal Growth Factor)
FBS	magzati szarvasmarha szérum	(Fetal Bovine Serum)
FDTD	időbeli véges differenciák módszere	(Finite Difference Time Domain)
FSR	szabad spektrális tartomány	(Free Spectral Range)
GSH	glutation tripeptid	
GM	kétfotonos hatáskeresztmetszet egysége	(Goeppert-Mayer)
GPU	grafikus kártya	(Graphical Processing Unit)
hCMEC	emberi szív mikroér endotél sejt	(human Cardiac Microvessel Endothelial Cell)
HF	hidrogén fluorid	
HOT	holografikus optikai csipesz	(Holographic Optical Tweezers)
LNP	lipid nanorészecske	(Lipid NanoParticle)
MEF	fém-erősített fluoreszcencia	(Metal Enhanced Fluorescence)
MEMS	mikro-elektromechanikai rendszerek	(Micro ElectroMechanical Systems)
MNP	fém nanorészecske	(Metal NanoParticle)
NA	numerikus apertúra	

NHS	N-hidroxiszukcinimid	
NP	nanorészecske	(NanoParticle)
OT	optikai csipesz	(Optical Trap/Tweezers)
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat	
PEG	polietilén-glikol	
PME	polimer mikroeszköz	
PMMA	poli(metil-metakrilát) (plexi)	
PSF	pontkiszélesedési függvény	(Point Spread Function)
RNS	ribonukleinsav	
SERS	felületerősített Raman szórás	(Surface Enhanced Raman Spectroscopy)
SLM	térbeli fázismodulátor	(Spatial Light Modulator)
STA	sztreptavidin fehérje	
STED	kényszerített emisszió kioltás	(Stimulated Emission Depletion)
SZBK	Szegedi Biológiai Kutatóközpont	
TPA	kétfotonos abszorpció	(Two-Photon Absorption)
TPP	kétfotonos polimerizáció	(Two-Photon Polymerization)
UV	ultraibolya	
WGM	suttogó galéria módus	(Whispering Gallery Mode)
YM	rugalmassági együttható	(Young’s modulus)

1. Bevezetés

Mikro-elektro-mechanikai rendszerek (MEMS) a XXI. század elején a tudományos kutatások eszköztárának egy egyre elterjedtebb és megkerülhetetlen elemét alkotják, és ez a szerteágazó technológia még mindig viharos ütemben fejlődik. Számos területen alkalmazzák őket az ipartól (méréstechnika, pl. szenzorok [1]) az egészségügyön (mikrofluidikai diagnosztikai rendszerek [2]) át a tudományos kutatásokig [3]. Eddigi tudományos munkám itt bemutatott összefoglalója ennek a technológiának egy szeletét érinti, a háromdimenziós lézeres mikrofabrikációt és az így előállított mikroeszközök elsősorban biológiai alkalmazásait. Bemutatott eredményeim felölelik a technika optimalizálásának és továbbfejlesztésének néhány módját, a mikroeszközök funkcióbővítésének lehetőségeit, azok alkalmazását a mikromechanikában, egyedi sejtek vizsgálatában és mikroszkópiás megfigyelésekben. Munkám során fő motivációm olyan mikroeszközök fejlesztése volt, amelyeknek - elsősorban, mint alapkutatási eszközöknek - követlen biológiai alkalmazása lehet. Bár a későbbiekben részletesen bemutatott technológia jellegénél fogva csak igen korlátozottan alkalmas pl. a gyógyászatban (diagnosztika, terápia) megkövetelt nagy példányszámú mikroeszköz előállítására, azonban olyan eszközöket adhat kutatók kezébe, amit elsősorban azok egyszerű testreszabhatóságának köszönhetően hatékonyan tudnak alkalmazni az egyedi sejtek vagy a biológiai makromolekulák mérettartományában végzett tudományos kutatómunkákban.

Az itt bemutatott munka egy additív lézeres direkt írásos technológián, a kétfotonos polimerizáción alapszik (TPP, Two-Photon Polymerization, az irodalomban többfotonos polimerizáció vagy mikro sztereolitográfia néven is megtalálható). Ebben egy ultrarövid impulzusú lézerből származó megmunkáló nyalábot fényérzékeny polimerbe fókuszálva és a mintát nagy pontossággal, három dimenzióban mozgatva hozhatunk létre komplex 3D mikroszerkezeteket. A TPP az 1990-es évek elején jelent meg a mikroméretű anyagmegmunkálási módszerek között [4], és az évtized második felében már háromdimenziós mikroszerkezetek is készültek ezzel a technikával [5]; a módszert használó tudományos közlemények száma ezután szinte exponenciálisan növekedett. Az SZBK Biofizikai Intézetében a technológiát Ormos Pál és Galajda Péter vezette be az ezredforduló környékén az optikai csipesszel (OT) végzett kutatásaikkal szinte egyidőben. Céljuk akkor az OT-vel kontrollált módon mozgatható és forgatható mikroeszközök polimerizálása volt, amely munka megmutatta, hogy ennek a két technológiának a házasítása milyen nagy potenciált hordoz [6].

A technológia azóta számos irányba fejlődött tovább: megjelentek módszerek a polimerizáció párhuzamosítására (adott szerkezet egy időben több példányban való elkészítése, [7, 8]), sikerült jelentősen megnövelni a módszer felbontását egy, a STED mikroszkópiához hasonló kioltásos technikával [9], a fotopolimerek kétfotonos hatáskeresztmetszetének kémiai növelésével lecsökkent a szükséges lézerteljesítmény [10, 11], és megjelentek hibrid rendszerek is, ahol a hozzáadott fém [12] vagy ko-polimer [13] segítségével a szerkezetek alkalmazhatóságát jelentősen kiterjesztették. A TPP-nek a kutatólaborokban való elterjedését az is elősegítette, hogy a kereskedelemben már egyre több gyártó professzionális rendszere vásárolható meg (Nanoscribe, Microlight3D, Moji-Nano).

A TPP-vel készült mikroeszközök kiválóan adaptálhatók különböző biológiai alkalmazásokhoz, amit jól jelez pl. a témában megjelent összefoglaló munkák száma is [14-18]. Az eszközök között megtalálhatók helyhez kötöttek, amelyek készítésük helyén látják el feladatukat, de a TPP alkalmas mobil szerkezetek készítésére is, amelyeket a mintatérben a felhasználás helyére kell juttatni. Ennek a mozgatásnak számos módja van (folyadékáramlással segített, mágneses vagy elektromos térrel hajtott), de az egyik legelterjedtebb az optikai vagy lézercsipesz használata [19, 20], amivel pár tíz nanométeres pontossággal lehet a szerkezeteket pozícionálni. Ez az egyre elterjedtebb, és 2018-ban fizikai Nobel-díjjal jutalmazott módszer számos bemutatandó eredményemben kulcsszerepet játszott.

Dolgozatomban áttekintem a téma irodalmát, majd bemutatom a TPP-vel létrehozott szerkezeteken alapuló saját eredményeimet a következő öt fő csoportban. Először kitérek a módszer párhuzamosítása és optimalizálása által elért hatékonyság-növelésre. Ismertetem azokat a kutatócsoportunk által készített mikromechanikai rendszereket, melyek egyrészt a visszavert fénnyel történő mozgatás alapvető fizikai törvényszerűségeinek mikrométeres mérettartományban történő vizsgálatát teszik lehetővé, másrészt pedig bemutatják a TPP és az optikai csipesz kombinálása nyújtotta manipulációs lehetőségek alapjait. Ezt követően bemutatok néhány, kutatócsoportunk által fejlesztett vagy továbbfejlesztett módszert a polimer mikroeszközök felületkezelésére, valamint ilyen kiterjesztett funkciójú eszközökkel elért eredményt. Konkrét biológiai alkalmazásokat mutatok be azokkal az egyedi sejtek jellemzésére kifejlesztett újfajta mikroeszközökkel és mérési eljárásokkal, melyekkel a sejtek mechanikai és felületi tulajdonságait vizsgáltuk. Végül ismertetem azokat a legújabban kidolgozott, merev és deformálható mikroszerkezeteken alapuló eljárásokat, amivel egyedi sejtek mikroszkópos

megfigyelését lehet segíteni, javítani, de akár sejtek közöti kölcsönhatás szabályozott előidézésére is alkalmasak.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A kétfotonos polimerizáció (TPP)

2.1.1. A TPP módszere

A kétfotonos polimerizáció egy lézeres additív mikrofabrikációs technika, a lézeres direkt írásos technológiai eszköztár egyik eleme. A lézeres direkt írás (Direct Laser Writing, DLW) azon technikák [21] gyűjtőneve, amelyekben fókuszált pásztázó lézernyalábbal az anyagot a megvilágítás helyéről vagy eltávolítják (szubtraktív módszer, [22]), vagy a megvilágított területre juttatják (additív módszer, [23]) vagy csupán valamilyen tulajdonságát változtatják meg (pl. törésmutató, [24]). A TPP legelterjedtebb fényforrásai közeli infravörös hullámhosszon (kb. 800 nm) működő ultrarövid impulzusú lézerek tipikusan 100 fs körüli impulzushosszal. Térnyerését nagyban elősegítette a korábbi titán-zafír lézertechnológiát felváltó jóval olcsóbb szállézerek elterjedése.

A TPP mikrofabrikációs eljárás során (1. ábra A) az ultrarövid impulzusú lézer fényét egy többnyire nagy numerikus apertúrájú objektívvel fókuszáljuk egy alkalmas fényérzékeny polimerbe, aminek hatására a fókusz egy, a megvilágítás paramétereitől függő kiterjedésű környezetében létrejönnek a polimer kötések. A mintát és a fókuszt egymáshoz képest mozgatva, ezeket a változásokat egy háromdimenziós útvonal mentén tudjuk előidézni. Ezután egy megfelelő oldószerrel a minta monomer fázisú részét eltávolítva visszamarad a kívánt struktúra. A TPP-vel tetszőleges alakú 3D polimer mikroeszközök (PME) hozhatók létre maximálisan néhány száz mikrométeres méretben és kb. száz nanométeres részletekkel, azzal az igen jelentős előnnyel, hogy ez a legtöbb esetben egyetlen lépésben megtörténhet. A később részletesebben bemutatott szerkezetek között megtalálhatók mikrofluidikai, mikrooptikai alkatrészek, de akár orvosi mikroeszközök is.

A TPP a kétfotonos mikroszkópiához hasonló módon a kétfotonos abszorpción (Two-Photon Absorption, TPA) alapszik. A TPP-re alkalmas fotopolimerek fényérzékeny összetevői a közeli infravörös tartományban elhanyagolható lineáris abszorpcióval rendelkeznek. Kellően nagy fényintenzitás mellett azonban megnő a 10^{-15} s körüli életidejű virtuális energiaszinttel jellemezhető kétfotonos abszorpció valószínűsége. Mivel a kétfotonos gerjesztéshez a második fotonnak ezen az időablakon belül kell találkoznia a molekulával, ehhez femtoszekundumos lézer nagy csúcsintenzitású impulzusa szükséges. A TPA jelenségét először Maria Goeppert-Mayer írta le PhD disszertációjában 1930-ban, és az ez iránti tiszteletből a kétfotonos

hatáskeresztmetszetet GM egységekben szokás kifejezni, ahol 1 GM = 10^{-50} cm^4 s photon^{-1}. Bár a lézeres mikroméretű 3D polimerizációra a TPP a legelterjedtebb módszer, az irodalomban van példa egyfotonos [25, 26] és háromfotonos [27-29] technikákra is.

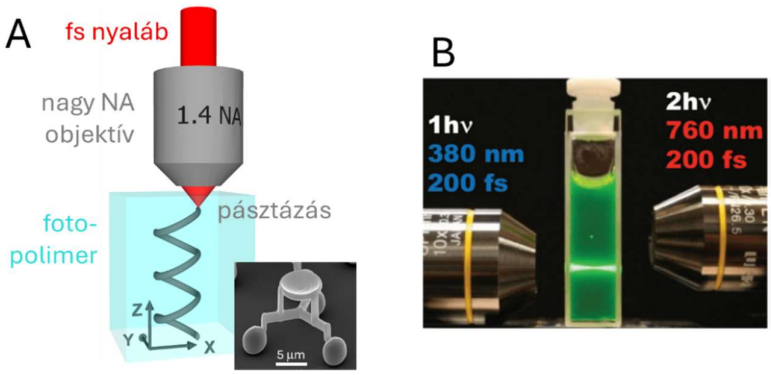
A TPP talán legfontosabb jellemzője, hogy a TPA csak a fókusz közvetlen közelében következik be (1. ábra B, [30]), ugyanis az ilyen módon egységnyi idő alatt elnyelt fotonok $N_{abs}(t)$ száma a beeső fényintenzitás négyzetével arányos a következők szerint [31]:

$$N_{abs}(t) = \int_V \delta\, C(r,t)\, I^2(r,t)\, dV, \tag{1}$$

ahol δ a kétfotonos hatáskeresztmetszet, C az elnyelő molekulák koncentrációja, I^2 a beeső intenzitás négyzete, V pedig a térfogat. A δ kétfotonos hatáskeresztmetszet a fotopolimer fényelnyelő molekuláját jellemzi, és annak harmadrendű $\chi^{(3)}$ szuszceptibilitása képzetes részével arányos [32]:

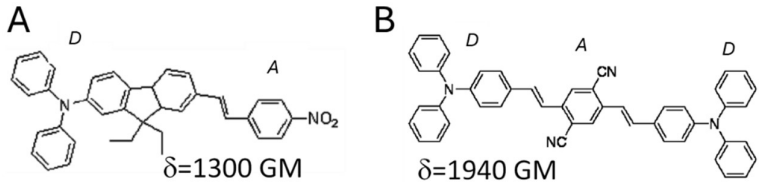
$$\delta = \frac{8\pi^2 h\nu^2}{n^2 c^2} \mathrm{Im}\left(\chi^{(3)}\right). \tag{2}$$

A négyzetes intenzitásfüggés az oka annak, hogy TPP-vel a fókusz diffrakciólimitált átmérőjénél kisebb méretű részletek is készíthetők, segítségével pedig modellezhető a polimerizáció terjedése [33]. A statikus fókusz körül megpolimerizált térfogat a polimer struktúrák voxel-nek nevezett elemi építőegysége, amelynek méretével és alakjával jól jellemezhető a polimerizációs paramétereknek a TPP-re kifejtett hatása [34, 35].



1. ábra. A kétfotonos polimerizáció és a kétfotonos gerjesztés. A: A kétfotonos polimerizáció vázlatos ábrázolása. Kis kép: egy polimerizált 3D szerkezet üveg hordozón. B: Az egy- és kétfotonos gerjesztés összehasonlítása. A fluoreszcens anyagot az oldatban egyfotonosan a nyaláb az általa megvilágított teljes térfogatban gerjeszti. Kétfotonosan ellenben csak a fókusz közvetlen közelében történik gerjesztés és emisszió.

A TPP-hez használt **fényérzékeny polimerek** (használatos elnevezés még: fotopolimer, fotoreziszt) alkotórészei a polimer mátrixot létrehozó anyag (monomer), a fényelnyelő kromofór és az iniciátor; vannak fotopolimerek, ahol az utolsó két szerepet ugyanazon molekula tölti be. Itt fontos megkülönböztetni a fotopolimerek két alapvető fajtáját: a pozitív és a negatív tónusú fotopolimereket. A pozitív tónusú esetében az anyag eleve polimer láncokból áll, és a megvilágítás hatására esik szét monomerekre, és válik oldhatóvá a legtöbb oldószer számára. A negatív tónusú fotopolimerek monomerjei pedig a megvilágítás hatására polimerizálódnak, és a meg nem világított rész távolítható el az oldószerekkel. A TPP módszere a negatív tónusú polimereket használja, és a dolgozatomban én is ezeket értem az egyszerű fotopolimer megnevezésen. A pozitív tónusú polimerek is megmunkálhatók a kétfotonos abszorpció segítségével [36-38].

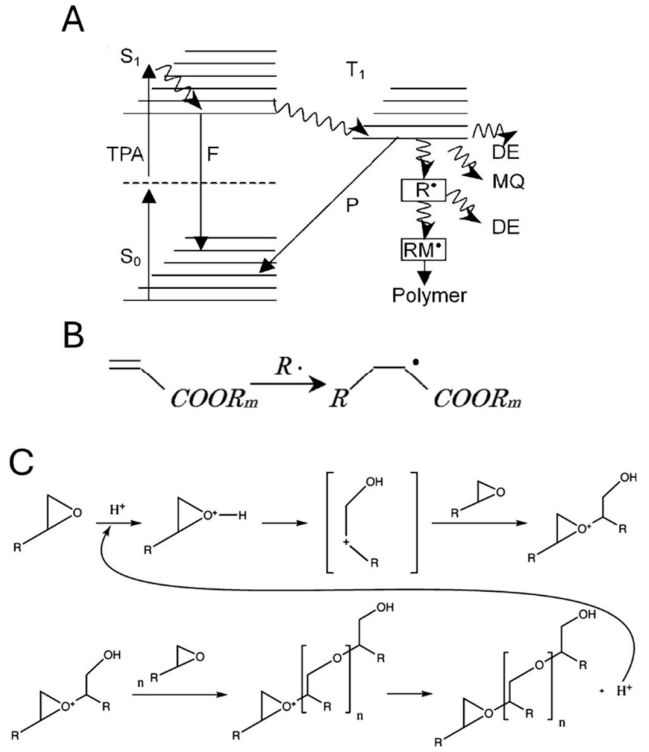


2. ábra. DA (A) és DAD (B) típusú érzékenyítő molekulák és a kétfotonos hatáskeresztmetszetük.

A monomereket fénnyel gerjesztett **iniciátorok** kötik össze kémiai úton. A 3D struktúrák diffrakció-limitált fókuszméretnél kisebb részletei csak egyrészt köszönhetők a négyzetes intenzitásfüggésnek, másrészt viszont annak, hogy a polimerizáció megindításához a gerjesztett állapotú iniciátoroknak el kell érniük egy küszöb koncentrációt [39, 40], ami pedig csak egy küszöb fényintenzitás fölött valósul meg. Az iniciátorok vagy maguk nyelik el a fényt, vagy egy érzékenyítő („sensitizer") nyeli azt el és gerjeszti az iniciátort sugárzásos vagy sugárzás nélküli energiaátadással [32, 40]. A TPP-t kezdetben UV-re optimalizált fotopolimerekkel végezték, melyeknek azonban nem volt megfelelően nagy a kétfotonos hatáskeresztmetszetük. A modern iniciátorok és érzékenyítők optimalizálása a kétfotonos hatáskeresztmetszet növelését jelenti [10, 11, 32], amivel a TPP hatékonysága jelentősen megnőtt. Ennek köszönhetően ma már polimerizálni a korábbiaknál jóval nagyobb, akár cm/s-os pásztázási sebességgel és jóval kisebb, szub-mW-os lézerteljesítménnyel is lehet. A legfejlettebb érzékenyítő molekulákban egy erős elektron donor és egy erős akceptor környezet található, amelyeket egy konjugált π-elektron rendszer köt össze. Elrendezésük lehet aszimmetrikus egyetlen donor-akceptor párral a molekula két végén (DA rendszer), vagy

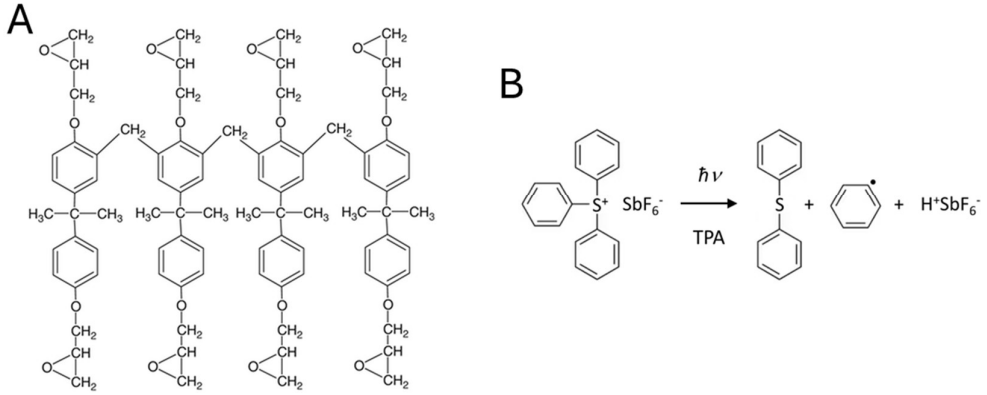
szimmetrikus, ahol a molekula két végén egy-egy donor vagy akceptor található, közepén pedig az ellentettje (DAD vagy ADA rendszerek, 2. ábra).

A **TPP energiadiagramja** (3. ábra A) azt az esetet mutatja, amikor az iniciátor egyben a fényelnyelő molekula is [40]. Miután az iniciátort a két foton elnyelése az első gerjesztett állapotba juttatta, az több módon is visszajuthat az alapállapotba, ám a polimerizáció csak akkor indulhat meg, ha a molekula az S1 állapotból egy rendszerek közti átmenettel („intersystem crossing") egy hosszú (akár másodperces) életidejű triplet állapotba kerül, és itt van ideje kialakulni annak az R reaktív gyöknek, ami az M monomerekkel már kölcsön tud hatni ($RM^{\bullet}$ állapot). A gerjesztett állapotú molekula reaktív gyökké válását megakadályozó lecsengési mechanizmusok között vannak sugárzásos átmenetek (fluoreszcencia vagy foszforeszcencia) de történhetnek sugárzás nélküli kioltások is (a monomerek vagy a többi gyök által). A polimerizáció sémája a reaktív gyök kialakulása után: $R^{\bullet}+M \rightarrow RM^{\bullet} \rightarrow RMM^{\bullet} \cdots \rightarrow RM_n^{\bullet}$.



3. ábra. A polimerizációs folyamat. A: A kétfotonos polimerizációs folyamat Jablonski diagramja (S0, S1: alap és gerjesztett elektronállapot, TPA: kétfotonos abszorpció, F: fluoeszcens lecsengés, T1: triplett átmenet, DE: deaktiváció, MQ: monomer kioltás, P: foszforeszcencia, R*: gerjsztett állapotú gyök, RM*: gerjszetett állapotó monomerhez kapcsolódó gyök). A reaktív gyökös (B, akril) és a kationos (C, epoxi) polimerizáció sémái.

A 3. ábra B panelje szerinti folyamat végén reaktív, vagyis párosítatlan elektronnal rendelkező gyök képződik és az indítja be a polimerizációt [40]. A polimerizációs folyamat egy másik módja az ionos polimerizáció (3. ábra C), amikor az iniciátor a gerjesztés hatására kationná (pl. valamilyen erős savvá) alakul át [41] és ez az ion reagál el a monomerrel. Az első ion-monomer reakció után a monomeren jelenik meg az ion által hordozott töltés és ezután ez a monomer fog a következő monomerrel elreagálni, amivel meg is kezdődött a polimerizáció.



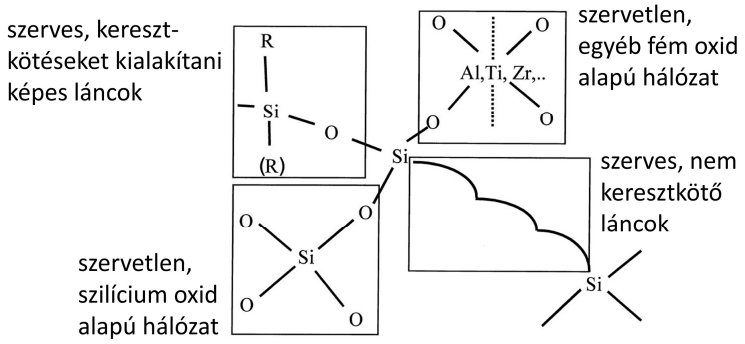
4. ábra. Az SU-8 fotopolimer. A: Az SU-8 monomerje. B: Az SU-8 iniciátora, valamint annak ionizációs sémája.

A **monomereknek** az őket összekötő kémiai reakció alapján alapvetően két csoportját lehet megkülönböztetni: az akril típusút és az epoxi-csoport alapút. Az akril típusúra példa a metil-metakrilát (polimerje a poli(metil-metakrilát), PMMA más néven plexi), amit reaktív gyök típusú iniciátorok kötnek össze a C=C kötések felszakításával (3. ábra B sémája). Az epoxi alapú monomerek kationos reakciókkal polimerizálódnak, ahol a gerjesztett iniciátor egy fényelnyelés hatására kialakuló sav, a polimerizáció pedig a felszakadó epoxi gyűrűk összekapcsolódása során megy végbe. A reakció kezdetén a sav által biztosított proton szakítja fel az első epoxi gyűrűt, aminek hatására kialakul a reaktív, töltéssel rendelkező monomer, ami aztán reagál a következő epoxi csoporttal (3. ábra C).

A disszertációban bemutatott munkám során kétféle fotopolimerrel dolgoztam: az egyik az SU-8, a másik az OrmoComp. Az SU-8 egy eredetileg a mikroelektronikai gyártási folyamatban használt, UV maszk litográfiával gerjesztett, epoxi alapú fotopolimer, ahol monomerenként nyolc epoxi gyűrű található (4. ábra A). Ezek kationos polimerizációval kapcsolódnak össze a triaril szulfonium hexafluoro antimonium só (4. ábra B), mint iniciátor segítségével a 3. ábra C sémája szerint. Az SU-8 kétfotonos abszorpciós koefficiense 28 cm TW^{-1} [42], ami bár nem kiemelkedően magas érték, a gyakorlatban megfelelő érzékenységet biztosít. A nyolc epoxi csoportnak köszönhetően a polimerizáció során nagyszámú

keresztkötés jön létre, ami a polimerizált SU-8-nak a műanyagok között viszonylag nagy mechanikai szilárdságot (Young-modulus 4-5 GPa), nagy hőtűrést (folyási hőmérséklet kb. 200 C°), és kémiai semlegességet biztosít.

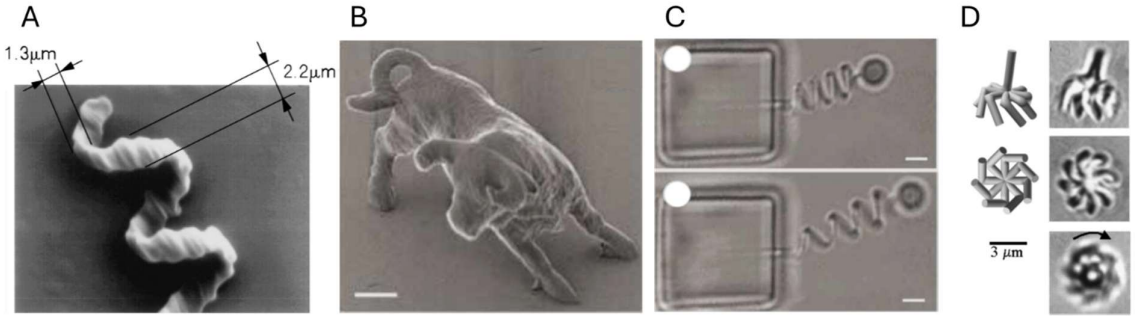
A másik fotopolimer az OrmoComp, amely az Ormocerek (**Or**ganically **mo**dified **cer**amics, szerves anyagokkal módosított kerámia) családjába tartozik. Ezt a fotopolimer családot Németországban a Fraunhofer Institut für Silicatforschung-ban fejlesztették ki, és négy fő alkotórész típusból áll (5. ábra) [43], de az OrmoComp pontos összetevői nem nyilvánosak. Elsősorban nagy elektromos ellenállása ($<10^{13}$ Ωcm) és jó tapadása teszi alkalmassá szigetelő rétegek kialakítására az elektronikában, de korróziógátló rétegként, valamit a fogászatban is előszeretettel használják. Az Ormocerek az UV tartományban nyelnek el fényt, ezért makroszkopikus alkalmazásuk egyszerű UV lámpás megvilágítással történik, ám TPP-vel készíthető belőlük 3D mikroszerkezetek is [44]. Az Ormocomp kétfotonos abszorpciós koefficiensére nem találtam értéket az irodalomban, de az ehhez nagyon hasonlóan alkalmazható Ormocore polimeré 27 cm TW^{-1}, ami érdekes módon az SU8-éhoz igen közel áll, és ez a polimerizációhoz szükséges paraméterek általunk tapasztalt hasonlósága miatt nem meglepő. Az OrmoComp mikroméretű alkalmazásának egy fontos aspektusa, hogy a Young-modulusa kisebb, mint a legtöbb fotopolimeré (a tömbi anyagé 1 GPa körüli), amit a 8.3 fejezetben bemutatott szerkezeteknél ki is használunk.



5. ábra. Az Ormocer polimer család általános felépítése.

Amint már volt szó róla, a TPP-hez a kétfotonos abszorpció elérése miatt ultrarövid impulzusú (τ~100 fs) **lézereket** szükséges használni. Ráadásul, ezeknek a hullámhosszán a fotopolimereknek elhanyagolható lineáris abszorpciója kell legyen. A legtöbb ilyen fényforrás hullámhossza ezért a közeli infravörös tartományban van (λ~800 nm). TPP-re tipikusan titán-zafír lézereket vagy frekvencia-kettőzött, erbiummal szennyezett kvarc aktív közegű szállézereket használnak.

Szintén alapvető fontosságú, hogy a precíz 3D szerkezetek előállításához a mintát és a lézer fókuszát egymáshoz képest néhány nanométeres pontossággal kell tudni **pásztázni**. Erre kétféle mód van: vagy a fix helyzetű mintához képest mozgatjuk a fókuszt, vagy fordítva. Az első pásztázási módot leggyakrabban egy billenthető tükörpárral érik el. Ennek a módszernek az előnye, hogy könnyedén el lehet vele érni a mm/s-os mozgatási sebességet, de hátránya, hogy a fókusz csak két dimenzióban mozgatható, és 3D struktúrák polimerizálásához a mintát a fókuszhoz képest a harmadik dimenzióban el kell mozgatni. Programozható diffrakciós optikai elemmel elérhető a fókusznak a mintában három dimenzióban történő pásztázása is a minta mozgatása nélkül [45]. Az álló fókusz körüli mintamozgatást a mintának egy piezo vagy légpárnás lineáris eltoló asztalra rögzítésével lehet elérni [46]. A piezo vezérlés előnye a kompaktság és a nagyobb pontosság (<10 nm), míg az utóbbié a nagyobb mozgatási távolság (cm) és sebesség (cm/s). A pásztázás logikáját tekintve lehet *raszteres*, amikor a fókusz a mintán folyamatosan, egy téglalap alakú területet teljesen lefedve pásztáz, és a lézert a pásztázás közben csak ott kapcsolja be a vezérlés, ahol a polimert meg kell világítani, illetve lehet *vektoriális*, amikor a pásztázás a tér mindhárom irányába történhet egyidejűleg, és aminek során, folytonos megvilágítás mellett, csak oda kerül a fókusz a mintában, ahol azt ténylegesen meg kell világítani. Ez utóbbi módszer során a lézer gyakorlatilag folyamatosan megvilágítja a mintát, de csak a szükséges helyeken, így ugyanazon szerkezet raszteres és vektoriális pásztázása esetén az elkészítés idejében több, mint tízszeres különbség is lehet [35].

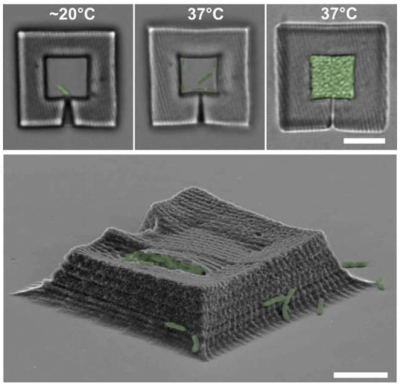


6. ábra. A TPP-vel készített korai 3D szerkezetek. Részletekért ld. a fő szöveget.

A kétfotonos polimerizáció módszerét az 1990-es évek elejétől fejlesztik, illetve használják. A legelső munkában Wu és munkatársai 4μm vastag polimer rétegbe készítettek egyszerű 2D struktúrákat egy 620 nm hullámhosszú, 100 fs impulzushosszú lézerrel: a fókuszátmérőnél keskenyebb, 0.3 μm széles falakat polimerizáltak, amiket 0.5 μm árkok választottak el [4]. Az első, kétfotonos polimerizációval készült valóban 3D szerkezet egy spirálrugó volt [5], 1 μm körüli vastagsággal (6. ábra A). A technológiát leginkább a kutatások

fősodrába emelő munkában Kawata és munkatársai 120 nm-es voxelméret demonstrálása mellett a Wall Street jelképének számító bikát készítették el 15 μm-es méretben (6. ábra B [39]). A technológia fejlesztésének egyik legfontosabb jövőbeli irányát azonban az a mérésük mutatta meg, ahol egy szubsztráthoz rögzített rugót polimerizáltak, amit aztán optikai csipesz segítségével ki is tudtak nyújtani (6. ábra C). Ugyanebben az évben jelent meg az Ormos Pál vezette munka intézetünkből, ahol helikális alakúra polimerizált szerkezeteket fogtak be és forgattak meg jól kontrollálható sebességgel optikai csipesz segítségével (6. ábra D [6]).

Már az előző évezred utolsó éveiben megtörtént a fotopolimerek fényelnyelő molekulája kétfotonos hatáskeresztmetszetének 1000 GM fölé való növelése kémiai módszerekkel [47], ami lehetővé teszi a kisebb lézerteljesítmények és nagyobb pásztázási sebességek alkalmazását. A 2000-es évek elejének egyik legfontosabb eredménye volt, hogy TPP-vel biológiai anyagokból, nevezetesen BSA fehérjéből és fibrinogénből is sikerült háromdimenziós szerkezetet készíteni [48]. Ezzel megnyílt a lehetőség, hogy teljesen biokompatibilis, a víz és ionok által átjárható, egyéb biológiai rendszerekkel együtt használható 3D szerkezetek készüljenek TPP-vel (7. ábra [49]).



7. ábra. BSA fehérjéből polimerizált baktériumcsapda *P. aeruginosa* kolónia (zölddel mesterségesen színezve) viselkedésének tanulmányozására. Méretskála: 5 μm.

2.1.2. A TPP párhuzamosítása

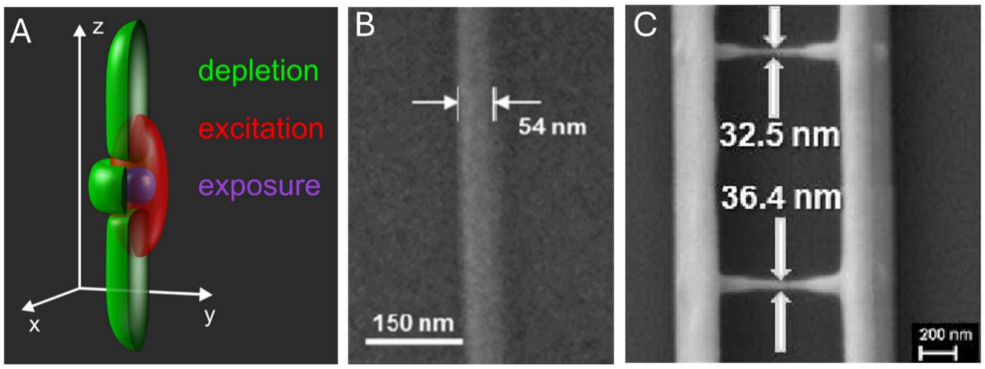
A kétfotonos polimerizációhoz általában néhány mW-os átlagteljesítményű ultrarövid impulzusú lefókuszált nyaláb elegendő, holott az alkalmazott lézerek átlagteljesítménye sokszor a 100 mW-ot is meghaladja. Emellett, a lézeres pásztázáson alapuló lineáris TPP időigényes folyamat: a fókuszált nyalábbal adott esetben egy több ezer köbmikrométeres tömböt kell végigpásztázni száz nanométeres vonalsűrűséggel. Adja magát a megoldás, hogy több fókusz egyidejű alkalmazásával a mikroszerkezetek előállítása jelentősen gyorsítható volna. Ennek egyik első megvalósításában az eredeti polimerizáló nyalábot kitágítva egy

mikrolencse mátrixon vezették át, ami több száz, közel azonos teljesítményt adó, egymástól kb. 5.5 μm-re lévő fókuszfoltot eredményezett ugyanabban a fókuszsíkban [50]. Itt egyetlen pásztázással kb. 20 000 μm^2-nyi területen állítottak elő kb. 700 db teljesen azonos szerkezetet. A rögzített elrendezésű mikrolencsék mellett egy digitális diffraktív optikai elemmel, a térbeli fázismodulátorral (Spatial Light Modulator, SLM) is elő lehet állítani több fókuszt a polimerizáló rendszerben. Ennek a programozható eszköznek az a nagy előnye, hogy a megtöbbszörözött fókuszok számát és helyzetét könnyen lehet változtatni, így nem meglepő, hogy a TPP-ben való alkalmazása előtt, már az UV lézert használó sztereolitográfiában is vizsgálták az SLM alkalmazhatóságát [51]. Takahashi és munkatársai a 2000-es évek végén megtöbbszörözött, rögzített helyzetű fókuszokkal, a mintát mozgatva demonstrálták a módszer alkalmazhatóságát egyszerű 2D szerkezeteken [52]. Ugyanebben az évben mutatták meg a TPP-vel kapcsolatban az SLM-nek azt a tulajdonságát, hogy vele a megtöbbszörözött polimerizáló fókuszok a mintában a tér mindhárom irányában mozgathatók, és így a minta mozgatása nélkül is előállíthatók teljesen azonos 3D szerkezetek [53]. Az SLM-mel előállított és mozgatható fókuszok pedig azt is lehetővé teszik, hogy egyetlen szerkezetet ne egyetlen fókusszal polimerizáljunk, hanem több fókusz koordinált mozgatásával, ami szintén felgyorsítja a TPP folyamatát [45]. A dolgozatban bemutatom a TPP párhuzamosítása terén az állandó értékű nyalábeltérítést biztosító kinoformmal, illetve a dinamikusan változtatható fókusz-elrendeződést biztosító SLM-mel végzett kísérleteimet, melyekkel egyrészt optikai csipesszel forgatható mikroszerkezeteket állítottam elő, másrészt pedig amelyet azóta rutinszerűen használunk laborunkban.

2.1.3. A TPP módszer fejlesztésének további irányai

A TPP módszer szent grálja a PME-k méretének csökkentése, amit a voxel átmérőjének csökkentésével, vagyis a **minél vékonyabb vonalak** készítésével lehet elérni. A 2000-es évek elején a technológia még csak a voxelátmérőnek a 300 nm-es értékről [54] a 100 nm környékére való csökkenését tette lehetővé [34, 39]. 2010 körül azonban megjelent egy, a STED mikroszkópia elvén működő voxelméret csökkentő módszer: az eredeti közeli infravörös polimerizáló nyaláb mellett egy második, speciálisan alakított intenzitás eloszlású kioltó nyalábbal (többnyire 532 nm) is megvilágítják a mintát, aminek hatására a polimerizálható vonalak szélessége („feature size”) az addigi kb. 100 nm-ről a 35-55 nm környékére csökkent

([9, 55-57] 8. ábra). A vonalszélességek további csökkenésének egyelőre a polimer nanoszálak csekély mechanikai stabilitása szab gátat.



8. ábra. STED-elvű felbontás növelés. A méretcsökkentés azon alapszik (A), hogy a pirossal jelölt gerjesztő nyaláb mellett a zölddel jelölt kioltó nyaláb sugárzásos átmenettel az alapállapotba juttatja az iniciátor molekulákat így azok csak a lilával jelzett térrészben kerülnek a hosszú életidejű triplet állapotba és képesek elindítani a polimerizációt. B: STED mikrofabrikációval polimerizált vonal elektronmikroszkópos képe. C: Újfajta, csekély autofluoreszcenciával rendelkező iniciátor felhasználásával, STED TPP-vel készült szálak elektronmikroszkópos képe.

A vonalszélesség csökkentése 100 nm alá és az elkészített **PME-k magasságának növelése** akár a mm-es mérettartományba látszólag ellentétes kívánalmak. Kis vonalszélességhez olajimmerziós, nagy NA-jú objektív szükséges, amelynek a munkatávolsága azonban kicsi: az objektív felületétől csak legfeljebb 200-300 μm távolságban képes polimerizálni. Erre adott megoldást Chichkov csoportja, akik a polimerizáló nyalábot lefókuszáló objektívet egy rászerelt feltét segítségével belemerítették a folyékony polimerbe, és a szubsztrátról kiindulva, attól távolodva készítettek több száz mikrométer magas szerkezeteket [14, 58]. Ez a módszer – amellyel az objektív munkatávolsága által meghatározott méretlimitáció megszüntethető – azóta már a kereskedelemben kapható rendszerekben is megjelent (pl. a Nanoscribe cég „Dip-in laser lithography” módszere).

A **polimer mátrixba kevert adalék anyagok** előnyösen képesek befolyásolni a polimer szerkezetek tulajdonságait: például mechanikailag ellenálóbbá vagy elektromosan vezetővé tehetik. Az elektromosan szigetelő polimerből vezető szerkezetek készítésére több módszert is találni az irodalomban. A PME-k tulajdonságainak fém nanorészecskékkel való befolyásolására három kézenfekvő eljárást mutattak be Im és munkatársai: i) a nanorészecskéket a megvilágító polimerizáló nyaláb hozza létre fotoredukcióval a polimer mátrix kialakítása közben, és a mátrix rögzíti is azokat, ii) a nanorészecskék már előre a fotopolimerbe keverik, a polimerizáció közben a kialakuló mátrix csak rögzíti őket, illetve iii) a kész nanorészecskék utólag a már elkészült szerkezetek felületére is tapaszthatók megfelelő

kémiai eljárásokkal [59]. Hasonlóan, Maruo és munkatársai polivinil-pirrolidon polimerbe kevert ezüst nitrát kétfotonos fotoredukciójával készítettek folytonos ezüst nanohuzalokat $3.5*10^{-7}$ Ωm fajlagos ellenállással [60]. Prasad csoportja SU-8 polimerbe kevert arany sót, amivel arany nanorészecskékkel szennyezett polimer csíkokat állítottak elő [12]. Elektromosan vezető polimer szerkezeteket szén nanoncsövek hozzáadásával is elő lehet állítani [61-63]. A nanoszálak tulajdonságai széles skálán alakíthatók; Staudinger és munkatársai például megállapították, hogy egyszerűen hosszabb nanocsöveket keverve a polimer anyagába, kisebb ellenállású szerkezetek hozhatók létre [62].

A **hidrogéleknek** TPP-vel készített szerkezetek alapanyagaként való alkalmazása sok szempontból szintén előnyös lehet. Bár mechanikailag kevésbé ellenálló, mint a hagyományos fotopolimerek, de túlnyomó részük biokompatibilis, és egy víz által átjárható környezetet tudnak biztosítani, ami elősegíti biológiai alkalmazásukat [64]. Ezek az anyagok, legyenek bár szintetikus vagy természetes alapú biopolimerek, megfelelően precíz kialakítás után alkalmasak pl. az extracelluláris mátrix modellezésére, ahol tág határok között változtathatók a sejt környezetének mechanikai tulajdonságai vagy porozitása, és ennek következében egyes molekulák vagy vezikulák általi átjárhatósága [65]; ezek a környezeti tényezők pedig akár a sejtek osztódását vagy differenciálódását is befolyásolhatják.

A kétfotonos polimerizáció egyik ígéretes, nemrégiben bemutatott alternatívája lehet, annak részletgazdagságát megtartva, a **kétlépéses polimerizáció** [66]. A kulcs a fotopolimer anyagának az a tulajdonsága, hogy egy UV fotonnal elegendően hosszú életidejű T_1 triplett állapotba vihető, ahonnan egy ugyanolyan UV fotont elnyelve egy gerjesztett triplet állapotba kerül. Ebben az állapotban pedig az iniciátor már képes a monomerek összekapcsolására. A ténylegesen létező T_1 állapot ebben a rendszerben a kétfotonos abszorpció fényelnyelés hatására létrejövő virtuális állapotát helyettesíti. Az összetevők szintén fontos eleme az a molekula, ami megakadályozza, hogy a fényelnyelő molekula az első foton elnyelése után elindítsa a polimerizációt. A kétlépéses polimerizáció legnagyobb jelentősége abban áll, hogy filléres, akár mW-nál is kisebb teljesítményű, 405 nm-es fényt kibocsátó lézert használ fényforrásként a drága ultrarövid impulzusú lézerek helyett.

2.2. A PME-k funkcionalizálása

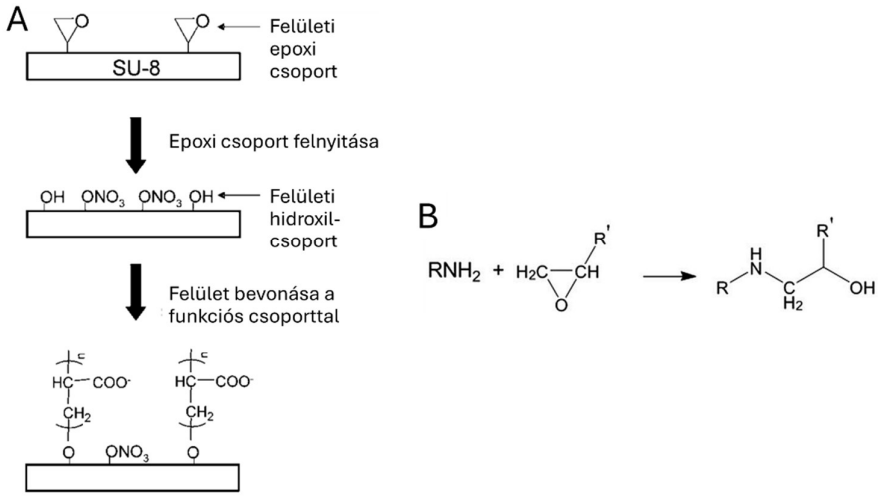
A polimer mikroeszközök alkalmazásaink körét nagymértékben ki lehet terjeszteni azok felületének fizikai vagy kémiai módszerek segítségével történő módosításával, bevonásával (a

továbbiakban: funkcionalizálás). A gyakoribb és tartósabb kémiai funkcionalizálás szinte mindig a polimer kötéseket is kialakító, még el nem reagált (akril vagy epoxi) csoportokon keresztül történik. A funkcionalizálás céljait tekintve a leggyakoribb az eredetileg nagymértékben hidrofób polimer felületeknek a biológiai, vagyis vizes környezetben való alkalmazásukhoz történő hidrofillá tétele. Erre a célra alkalmas a felületek oxigén plazmás [67], kénsavas [68, 69] vagy katalizált salétromsavas [70, 71] kezelése, vagy egy megfelelő ko-polimernek a fotopolimerhez keverése (glicidol, [72]), melyek végeredménye szinte mindig felületi –OH csoportok kialakulása. További funkciónövelés például a mikroszerkezetek fémmel történő, akár hely-specifikus bevonásával érhető el; a leggyakoribb cél ebben az esetben természetesen a szigetelő polimerek felületén elektromosan vezető struktúrák kialakítása. Erre az egyik leggyakrabban használt módszer az autokatalitikus fémezés (electroless plating). Ekkor a polimer felületet első lépésként olyan szerves anyagokkal vonják be, amelyek a fémréteg nukleációját segítik. A módszert sikeresen demonstrálták akril és epoxi alapú mikroszerkezetek esetében egyaránt, amelyeket etiléndiaminnal (EDA) kezeltek. Az EDA a felületen a keresztkötésben részt nem vevő csoportokkal reagálva egy monorétegnyi amino csoportot hoz létre, amely aztán fém ionokat (arany, palládium) képes redukálni [73, 74]; ezekre a nukleációs pontokra aztán később további, akár mikrométeres vastagságú fém rétegeket lehet növeszteni.

Biológiai alkalmazás szempontjából a legrelevánsabb funkcionalizálás természetesen valamilyen szerves molekulának a felülethez kötése. Ez lehet egyszerű molekula, mint pl. a fentebb említett EDA, de akár fehérje vagy DNS is. A funkcionalizálás módjait és céljait felsorolni önmagában legalább még egy disszertációt igényelne. A cél, általánosan fogalmazva, a leggyakrabban valamely biológiai makromolekula specifikus kikötődésének elérése, illetve sejtek tapadásának elérése vagy meggátlása a felületekhez. A funkcionalizáló molekula kikötése történhet fizikai elvek alapján (pl. elektrosztatikusan), vagy kovalensen. A kovalens kikötésre számos módszer létezik, de kulcs minden esetben az első lépés, a monomerek aktív csoportjával való reakció. Akril alapú polimereknél Michael-reakcióval lehet könnyedén a felülethez kötni amino- vagy tiol csoportokkal rendelkező molekulákat, míg az epoxi-alapúaknál b-nitrato alkohol csoportok létrehozásán keresztül (9. ábra A, [70, 71]) vagy pl. az epoxi és amino csoportok közvetlen reakciójával (9. ábra B, [75, 76]). Ebben az első lépésben általában egy köztes molekula („linker”) tapad a felülethez (pl. valamely szilán vagy PEG-

származék), amelyhez pedig már a véglegesen kikötni szándékozott molekulát lehet kapcsolni [77, 78].

A dolgozatomban a polimer mikroszerkezetek szervetlen és szerves anyagokkal történő felületkezelésével kapcsolatos eredményeimet is bemutatom, amelyekkel demonstrálom a komplex mikroeszközöknek a szenzorikában illetve egyedi sejtek optikai manipulációjában való alkalmazhatóságát.



9. ábra. Epoxi polimer felületi funkcionalizálása. A: Funkcionalizálás savas kezeléssel. B: Epoxi csoport és amino csoport reakciója.

2.3. Az optikai csipesz, mint a PME-k mozgatásának egyik módja

A polimer mikroeszközök hatékony és precíz mozgathatósága szintén jelentősen kiszélesíti alkalmazási körüket, amit a témában született összefoglaló művek száma is jól mutat [79, 80]. A PME-k mozgatására akusztikus [81, 82], mágneses [83-85] és optikai módszerek [19, 86] is rendelkezésre állnak. Az optikai módszerek közül az optikai csipesz („Optical Trap”, OT) kiemelkedik precizitásával és szelektivitásával: ezzel a módszerrel 10 nm nagyságrendű pontossággal lehet az egyes, előre kiválasztott szerkezeteket pozícionálni, illetve mozgatni [87, 88].

Az optikai vagy lézercsipesz [89, 90] segítségével fénnyel lehet a mikrométer nagyságrendjébe eső testek helyzetét a térben rögzíteni. Ez azt jelenti, hogy eredetileg Brown-mozgást végző test a csapdázás során egy – ideális esetben – harmonikus potenciálvölgyben erősen csillapított fluktuációt végez A jelenség alapja, hogy a csapdázott test fénytörés révén megváltoztatja a fény terjedésének irányát és ezzel impulzusát. A módszerrel azokat a testeket

lehet csapdázni, amelyek nem nyelik el a csapdázó fényt és törésmutatójuk nagyobb, mint az őket körülvevő anyag törésmutatója. A fényútba kerülő testre két erő hat: az egyik az ún. gradiens erő, ami az intenzitás gradiensével arányos és a növekvő intenzitás felé hat (pl. fókusz, vagy kollimált Gauss nyalábnál a nyaláb közepe), a másik a szóróerő, ami az intenzitással arányos és a fénynek a testről való szóródása miatt a fény terjedési irányába hat (fénynyomás) [91]. A testre ható F erőnek ezt a két komponensét az *m* koordinátatengely mentén a (3) egyenlet mutatja be, ahol α' a részecske polarizálhatóságának valós része, α'' a képzetes része, E' az elektromos térerősség amplitúdója, ϕ' pedig a fázisa. A csapdázás abban az esetben valósulhat meg, ha a gradiens erő (első tag) nagyobb, mint a szóróerő (második tag).

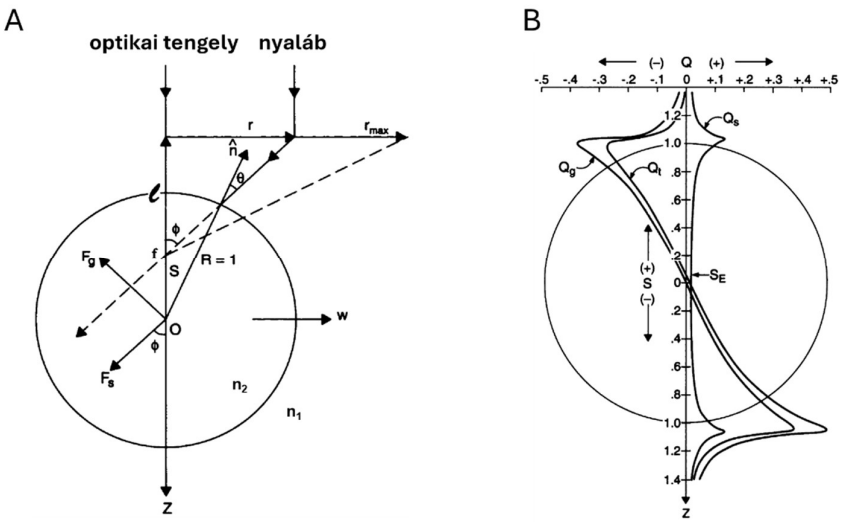
$$F_m = \frac{1}{2}\sum_{j=x,y,z}\left[\alpha'\frac{1}{2}\frac{\partial({E'_j}^2)}{\partial r_m} + \alpha''{E'_j}^2\frac{\partial\phi'}{\partial r_m}\right] \tag{3}$$

Az optikai csipesz számos elrendezésben megvalósítható, de mi a PME-k mozgatásához a leggyakrabban használt ún. egynyalábos csipeszt alkalmaztuk [92]. Ezt egy kollimált lézernyaláb nagy NA-jú objektívvel lefókuszált fénye alkotja. A PME-k mérete jóval nagyobb, mint a hullámhossz, emiatt itt geometriai optikai közelítéssel célszerű kiszámolni a testre ható erőket. Egy gömb alakú test adott pontjára θ beesési szöggel érkező keskeny nyaláb által kifejtett F_s szóróerő és F_g gradiens erő a következőképpen írható fel (11. ábra A) [93]:

$$F_s = \frac{n_1 P}{c}\left\{1 + R\cos 2\theta - \frac{T^2[\cos(2\theta-2r)+R\cos\quad]}{1+R^2+2R\cos 2r}\right\} \tag{4}$$

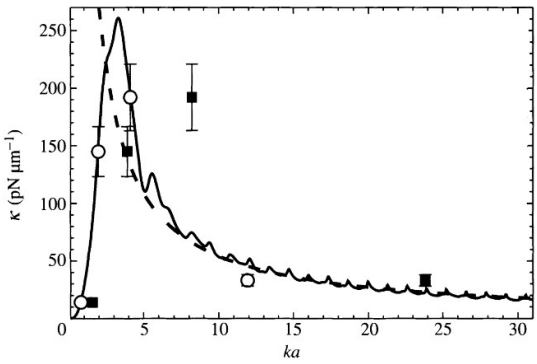
$$F_g = \frac{n_1 P}{c}\left\{R\sin 2\theta - \frac{T^2[\sin(2\theta-2r)+R\sin 2\theta]}{1+R^2+2R\cos 2r}\right\} \tag{5}$$

ahol *P* a teljesítmény, n_1 a közeg törésmutatója, az *R* és *T* mennyiségek pedig a felület adott pontjára vonatkozó Fresnel reflexiós és transzmissziós együtthatók. Ebben a tárgyalásban F_s mindig a beeső nyaláb irányába hat, F_g pedig mindig arra merőleges. Az erők nagyságát a kapcsos zárójelekben lévő, az irodalomban *Q*-val jelölt mennyiségek határozzák meg. A gömbre ható teljes erőt az összes θ irányra vett összegzés adja meg.



11. ábra. Az optikai csipeszben ébredő erők magyarázata. A: A csapdázandó gömb felületére beeső nyaláb által kifejtett F_s és F_g erők eredete. Az optikai tengellyel ϕ szöget bezáró és a fókuszáló objektívbe r távolságban belépő nyaláb θ szöggel esik be a felületre és az f fókuszba tart. B: Az egységnyi sugarú gömbre ható erők relatív nagysága a z tengely mentén történő S eltolás függvényében.

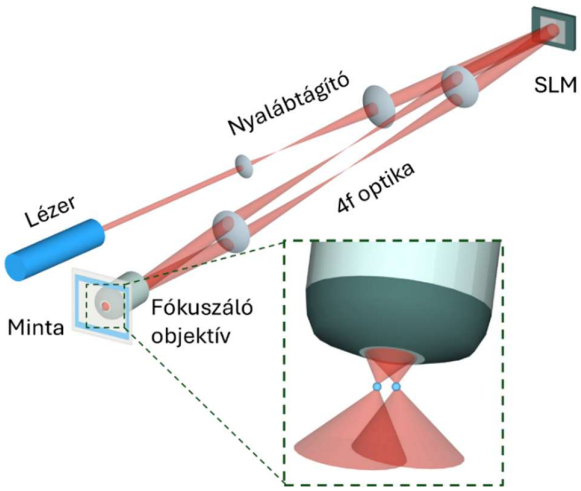
A 11. ábra B panelja azt ábrázolja, hogy a Q_t (gradiens és szóróerők összegével arányos) értéke a gömb tengelyirányú, a sugárnál kisebb mértékű elmozdulása esetén mindkét irányban olyan előjellel változik, ami a fókuszhoz közeli S_E pont (egyensúlyi helyzet) felé mozdítja a gömböt: a test csapdázása biztosított ($\phi_{max} = 70^o$, $n_2/n_1 = 1.2$, homogén intenzitás eloszlás az objektív belépő apertúrájánál). A stabil tengelyirányú csapdázáshoz szükséges, hogy a ϕ értéke megfelelően nagy legyen, vagyis a nyalábot nagy szögben kell lefókuszálni. Az optikai tengelyre merőleges elmozdulás esetén hasonlóan levezethető visszatérítő erők lépnek fel.



10. ábra. Laterális csapdaállandó a $\beta = ka$ függvényében, ahol a jelöli a gömb sugarát, k pedig a csapdázó fény hullámszámát (itt: $k = 7.8\ \mu m^{-1}$). A lézerteljesítmény 60 mW, $n_1 = 1.32$, $n_2 = 1.57$, $\theta_{max} = 70^o$. Folytonos vonal: Mie-szórást felhasználó számítás, szaggatott vonal: geometriai optikai közelítés. A körök és a vonalak mérési pontokat jelölnek. A maximális csapdaállandó $\beta = 3$-nál van, ami kb. 770 nm átmérőjű gömböt jelent. [94]

Az egynyalábos lézercsipesszel tipikusan néhány száz nanométertől a néhány mikrométerig terjedő méretű testeket lehet csapdázni. Mivel ekkor az optikai tengely irányában a csapdázás csak a nagy NA-jú objektívekkel lehetséges, ez viszont tipikusan 1 μm-nél kisebb fókuszátmérőt hoz létre, így a csapdázott testek mérete ennél jelentősen nagyobb csak a csapdaerő csökkenése árán lehetséges (10. ábra). Az irodalomban számos munka tárgyalja kvantitatívan fény hullámhosszának, a fókuszáló objektív paramétereinek és a csapdázható testek méretének, törésmutatójának hatását az optimális csapdázásra [94].

A csapdázott PME-k mozgatását egyszerűen a fókusz mozgatásával lehet elérni. A mozgatás maximális sebességét a közegben haladó testre ható viszkózus ellenállás határozza meg. Összetett alakú testek mozgatását megkönnyíti, hogy a csapdázó lézer eredetileg egyetlen nyalábja fázisfront módosító eszközökkel meg is többszörözhető, és az így kialakuló több fókuszpont pedig akár egymástól függetlenül is mozgatható (többfókuszú csipesz, 12. ábra). A gyakorlatban használt leghatékonyabb fázisfront módosító eszköz a térbeli fázismodulátor (Spatial Light Modulator, SLM), az általa kialakított csipeszt pedig holografikus optikai csipesznek hívják (Holographic Optical Trap, HOT). A HOT-tal egy vagy több test egyidőben több ponton megragadva szabadon transzlálható és forgatható (6 szabadsági fokú mozgatás). A később bemutatott eredményeimben a HOT alapvető szerepet játszik, hatékonysága és pontossága nélkülözhetetlen az egyedi sejtek általunk megvalósított manipulációjához.



12. ábra. Többnyalábos optikai csipesz egy lehetséges elrendezése. Ebben az esetben a diffraktív elem két nyalábot, vagyis a mintában két csapdázó fókuszt hoz létre.

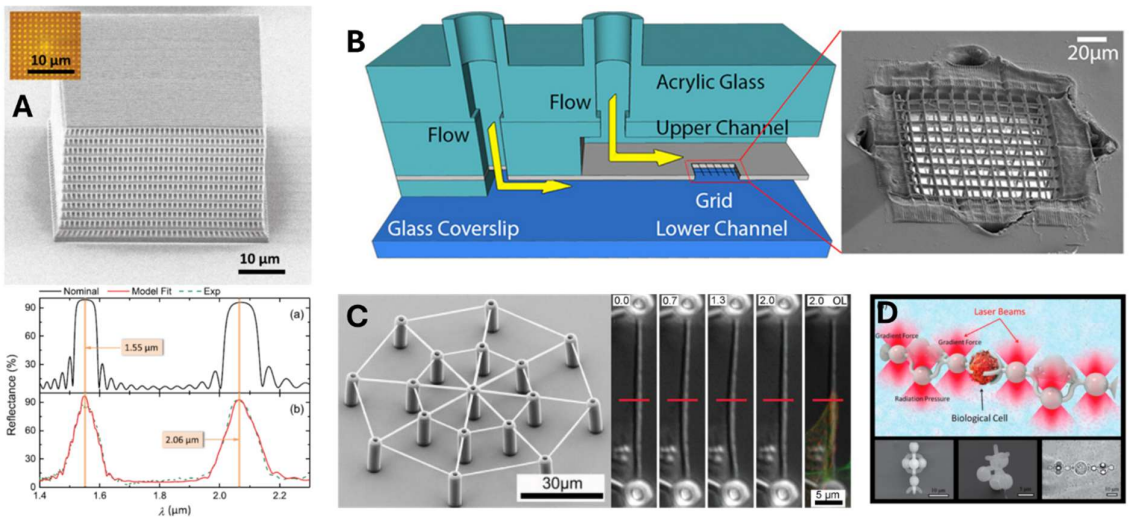
2.4. Példák a PME-k alkalmazásaira

Bár a TPP-vel létrehozott mikroszerkezeteknek ipari mennyiségűre való felskálázására már voltak próbálkozások [46, 95], az eszközök alkalmazásának túlnyomó részét ma még

kutatólaboratóriumok falain belül találhatjuk (13. ábra). A kialakított struktúrákat vagy a kialakítás helyszínén a felülethez rögzítve használják, vagy a felületről leválasztva, szabadon mozgó eszközként. A felülethez kötött szerkezetek egyik legkorábbi alkalmazása a mikro-optikában volt: periodikus szerkezetek polimerizálásával hoztak létre a közeli infravörös hullámhossztartomány egy adott sávjában nagy reflexióval rendelkező optikai szűrőket körülbelül 100 μm-es méretben [96-98]. Az ilyen eszközök létrehozását jelentősen hatékonyabbá lehet tenni több nyaláb használatával, amelyek interferenciájával előálló periodikus intenzitásmintázat egyetlen statikus megvilágítással képes polimerizálni nagy felületű két- vagy háromdimenziós periodikus szerkezetet egyfotonos [99] vagy kétfotonos [100] polimerizációval. Az optikai szűrő működési hullámhossz tartományát a közeli infravörösből a láthatóba a rácsállandó csökkentésével lehet eltolni, amit a TPP felbontásának javulása tett lehetővé [101]. Mikrofluidikai rendszerekben szűrési feladatokra is alkalmazhatók hasonló periodikus szerkezetek: adott szuszpenzióban részecskeméret alapján könnyedén lehetett szelektálni akár az 1 μm mérettartomány körül is [102]. A PME-k számos biológia alkalmazása közül [15, 16] kiemelem azt, ahol az előzőhöz hasonló szerkezetet használtak sejttenyészetben térelválasztásra kollégáim a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban: itt a sejteket a mikrofluidikai rendszer két kamráját elválasztó periodikus rácson növesztették úgy, hogy a két kamrában eltérő összetevőjű folyadék keringett [103]. Rugalmas mikroeszközökkel vizsgálható az egyes szívizom sejtek összehúzódása során kifejtett erő. Ehhez a sejteket a rugalmas anyagból polimerizált szálakon növesztették, majd egyszerű fénymikroszkóppal megfigyelték a sejtek összehúzódása során a szálak elhajlásait. Ebből és a szálak AFM-mel kalibrált rugalmasságából ki tudták számolni, hogy az adott sejtek kb. 50 nN erőt fejtettek ki [44].

Mozgatható PME-k megtalálhatók a mikrofluidikában pumpákként alkalmazva, vagy biológiai vizsgálatok esetében pl. sejtek mozgatását célzó alkalmazásokban. Speciális alakú, tengelyhez rögzített, lézercsipesszel forgatott pumpákkal keskeny mikrofluidikai csatornákban pikoliter térfogatú folyadékot lehet mozgatni <1 μm/s áramlási sebességgel [86, 104]. Ezeket a pumpákat vagy a lézercsipesszel közvetlen módon csapdázva, vagy az azt létrehozó nyaláb szóródása során fellépő impulzus-átadás révén lehet forgatni. Hasonló térfogatú folyadék pumpálását konvekciós elven is demonstrálták, amihez szelektíven fémmel bevont és lézernyalábbal lokálisan melegített mikroszerkezetet használtak [105]. Egyedi sejtek vagy sejt méretű részecskék mikroszerkezetekkel történő mozgatására számos megközelítés található az

irodalomban. Optikai csipesszel nem tengelyhez kötötten forgatható kerekek segítségével elő lehet állítani folyadékáramlást, amely áramlás aztán magával ragad sejtméretű részecskéket [19]. Ennél közvetlenebb az a módszer, ahol a mikroszerkezetek optikai csipesszel való mozgatás révén magát a sejtet tolják maguk előtt egy felületen tetszőleges irányban [106]. Nem letapadó sejteket a PME-k segítségével el is lehet emelni a felületről a harmadik dimenzióba és körbe is lehet forgatni, ahogy azt két, optikai csipesszel mozgatott szerkezet segítségével be is mutatták [107].



13. ábra. Példák a PME-k alkalmazásaira. A: 50 µm széles fotonikus kristály szerkezet (fent) megtervezett reflektancia spektrummal (lent) a közeli IR tartományban. B: A HUN-REN SZBK-ban használt mikrofluidikai sejttenyésztő rendszer vázlata (balra) a két folyadékteret elválasztó mikrorács rendszerrel (jobbra). C: Szívizom sejtek növesztésére szolgáló platform (balra) és az egyik szálnak a rajta lévő izom összehúzódása miatti alakváltozása. D: Nem letapadó sejt két, optikai csipesszel mozgatott mikroeszközzel való forgatása.

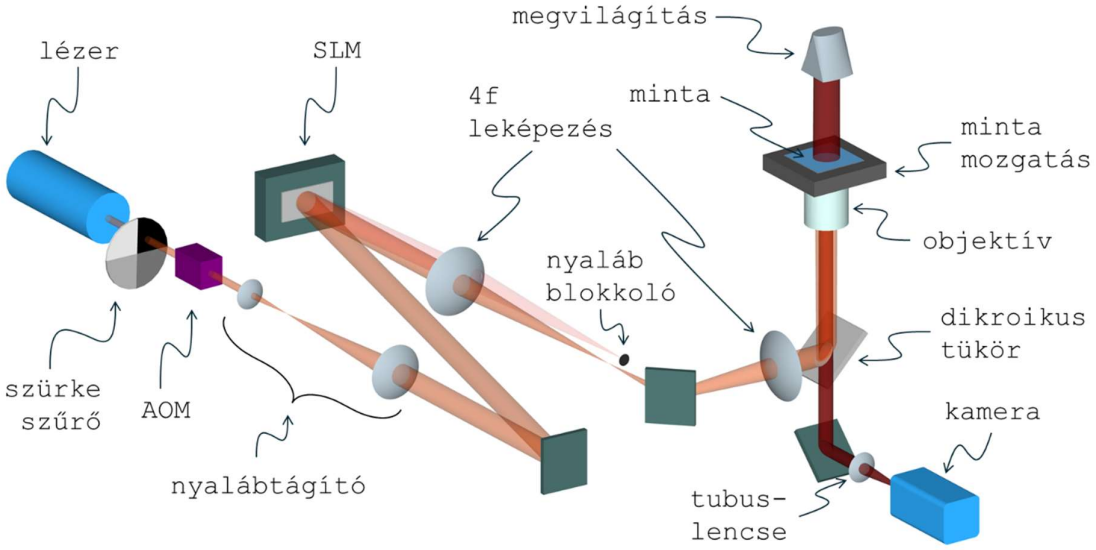
Dolgozatomban bemutatom, hogy funkcionalizált, célszerűen megtervezett alakú PME-kkel hogyan lehet hat szabadsági fokkal, mégis néhányszor tíz nanométeres pontossággal egyedi sejteket mozgatni, valamint, hogy ezek hogyan segítenek egyedi sejtek vizsgálatában és az optikai mikroszkópos képalkotásban. Bemutatom továbbá a funkcionalizálás nélkül, deformálható mikroeszközökkel elért egyedi sejtmanipulációs eredményeinket is.

3. Kísérleti eszközök

A dolgozatban bemutatott munkák során sok technikát és eljárást használtam. Ezek közül a két legalapvetőbbet mutatom be itt részletesebben, az egyes konkrét kísérletekhez tartozókat az azokat bemutató fejezetekben ismertetem.

3.1. A kétfotonos polimerizáló rendszerünk felépítése

A disszertációban leírt munkáimhoz saját építésű, és az évek alatt folyamatos fejlesztésen átesett kétfotonos polimerizáló rendszert használtam. Laborunkban jelenleg az alább bemutatott rendszer található. A korábbi verziók bemutatásától, amelyekkel a 2018 előtt publikált munkák készültek, azért tekintenék el, mert a folyamatos fejlesztés miatt túl sok, az azzal készített szerkezetek használhatósága szempontjából jelentősen nem eltérő verziót kellene felsorolni. A kétfotonos polimerizáló rendszerünk sematikus elrendezését a 14. ábra mutatja.



14. ábra. A laborunkban jelenleg használt kétfotonos polimerizáló rendszer vázlatos optikai elrendezése. A bemutatott elrendezés az SLM alkalmazásával lehetőséget ad a több nyalábbal történő párhuzamos polimerizációra.

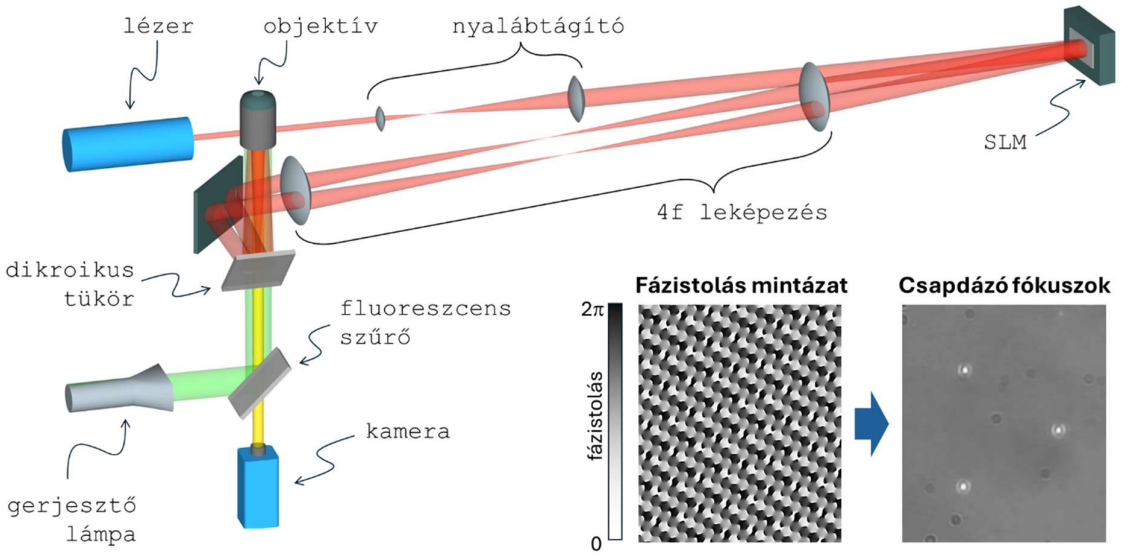
A polimerizáló rendszer egy rezgésmentes asztalon helyezkedik el (Supertech Kft, Pécs). A fényforrása kezdetben egy magyar építésű Ti-zafír lézer volt, amit egy jelenleg is használt, sokkal kisebb méretű és stabilabb szállézerre cseréltünk (C-Fiber A, Menlo Systems, Németország, impulzushossz: 100 fs, ismétlési frekvencia: 100 MHz, hullámhossz: 785 nm, átlagos teljesítmény: 140 mW). A nyaláb teljesítményét először egy állítható szürke szűrővel (NDC-50C-2M, Thorlabs, USA) csökkentjük le annyira, hogy a végleges teljesítmény

eléréséhez a következő akuszto-optikai modulátor (AOM, APE 130.101, APE GmbH, Németország) lineáris tartományát lehessen használni. Az objektívbe bejutó nyalábteljesítményt tipikusan 3 mW és 10 mW között változtatjuk az AOM-mel, a szerkezet elérni kívánt méretei és a használt fotopolimer függvényében. A nyalábtágítóval a nyaláb átmérőjét (kb. 8 mm) hozzáigazítjuk a nyalábútban opcionálisan következő SLM (Pluto-NIR, Holoeye GmbH, Németország) aktív felületének méretéhez, és az objektív belépő apertúrájának átmérőjéhez. A polimerizáló elrendezésben a lézer eredeti egyetlen nyalábjából SLM-mel több, gyakorlatilag azonos teljesítményt hordozó nyalábot készíthetünk [108]. Ezzel rutinszerűen polimerizálhatunk egyetlen pásztázással több (tipikusan <10) azonos szerkezetet. Amennyiben egyetlen nyalábbal polimerizálunk, az SLM elé egy felbillenő tükröt helyezünk. Az SLM felületének fázismintázatát egy 4f lencserendszerrel képezzük le a fókuszáló objektív hátsó apertúrájára. A 4f rendszer közepén egy nyaláb blokkoló takarja ki a fényútból az SLM-mel nem módosított nulladik rendű nyalábot. A továbbhaladó nyalábokat egy olajimmerziós objektív (2005-2020 között: Zeiss Achroplan 100x NA=1.25, 2020 után: Zeiss C-Plan Apo 40x NA=1.2) fókuszálja a mintába. A fókusznak és az üveg hordozónak az egymáshoz viszonyított helyzetét az esetenként több órás polimerizációs folyamat során egy saját fejlesztésű fókusztartó algoritmus stabilizálja.

A minta nanométeres pontosságú pásztázása egy 3D piezo asztallal történik (P-563.3CL PIMars, Physik Instrumente, Németország), aminek a mozgási tartománya a tér mindhárom irányában 300 μm. Az általunk maximálisan használt 200 μm/s mozgatási sebességnél a piezo asztal már nem képes pontosan követni a pásztázás előre megtervezett útvonalát, ezért 50 μm/s felett az útvonalat egy előkompenzáló algoritmussal megváltoztatjuk, hogy a végső útvonal már pontosabban kövesse a tervezettet. A piezo asztalt egy léptetőmotoros mikroszkóp asztalra rögzítettük (SCAN IM 120x100, Märzhäuser Werzlar GmbH, Németország), ami több centimétert tud mozogni mikrométeres pontossággal, ezzel biztosítva, hogy akár több négyzetmilliméteres területen is tudjunk polimerizálni. A mintát felülről egy LED-del világítjuk meg, amely hullámhossza nem polimerizálja azt, és a mikroszkóp objektív, egy tubuslencse és egy kamera segítségével figyeljük meg. Az AOM, a piezo és léptetőmotoros asztalok, valamint a kamera saját fejlesztésű, Labview platformon elkészített számítógépes vezérléssel dolgoznak, ami a fókusztartó algoritmust is magában foglalja. Az SLM-et a számítógép másodlagos képernyőjének állítottuk be, az arra kerülő fázismintázatot pedig egyszerű szürkeskálás Windows háttérként jelenítjük meg a felületén.

3.2. Az optikai csipesz rendszer

Az optikai csipesszel mozgatott mikroeszközök 3 dimenzióban történő mozgatásához egy többfókuszú, holografikus optikai csipesz rendszert („Holographic Optical Tweezers”, HOT) használtunk, melyet egy invertált, széles látóterű, fluoreszcens Nikon gyártmányú mikroszkóphoz illesztettünk (Eclipse TI, Nikon Corp., Japán). Ezzel a mikroszkóp objektívje egyszerre végezte a képalkotást és állította elő a csipeszeléshez szükséges fókuszált nyalábot is. A több csapázó fókusz létrehozásához ebben a rendszerben is SLM-mel módosítottuk a lézernyalábot. Az optikai csipesz rendszerünk elrendezését a 15. ábra mutatja.



15. ábra. A laborunkban használt holografikus optikai csipesz rendszer vázlatos elrendezése. Az ábrázolt fázistolás mintázat megjelenítése az SLM felületén generálja az ábrázolt három csapdázó fókuszfoltot,

A fényforrás egy közeli infravörösben működő folytonos lézer (λ = 1064 nm, P_{max} = 10 W, lineárisan polarizált, YLM-10-1064-LP, IPG Laser GmbH, Németország). A nyalábot egy nyalábtágítóval akkorára tágítottuk, hogy az SLM (Pluto-NIR, Holoeye GmbH, Németország) felületének az a területe, ami pontosan az objektív belépő apertúrájára van leképezve, majdnem homogén intenzitáseloszlással legyen kivilágítva. Erre azért volt szükség, hogy azok szélső nyalábok is, amelyek elsősorban kialakítják az axiális irányú csapdát, megfelelő intenzitásúak legyenek. Az SLM felületét egy 1-szeres nagyítású 4f lencserendszerrel képezzük le a mikroszkópobjektív hátsó apertúrájára. A nulladik rendű nyalábot ebben a rendszerben is egy nyaláb blokkoló takarja ki a 4f rendszer közepén. A Nikon mikroszkópban két fluoreszcens szűrőkocka tartó helyezkedik el egymás felett. Ez teszi lehetővé, hogy a csapdázó fényt be lehessen csatolni a fényútba, és ezzel egyidőben

fluoreszcens megfigyelést is lehessen végezni. A felső szűrőkocka tartóban egyetlen dikroikus tükör foglal helyet, ami a 1064 nm-es lézernyalábot felfelé, az objektív felé reflektálja, és a látható tartományban átenged, alatta pedig a megfigyeléshez éppen szükséges fluoreszcens szűrőkockák találhatók. A mikroszkópban egy vízimmerziós objektív fókuszálja a mintába a nyalábot (NA=1.2, Olympus UPlanSApo). A megfigyelést vagy egy egyszerű CCD kamerával (GS3-U3-23S6M, Point Grey Research Inc., Kanada), vagy egy nagy érzékenységű CMOS kamerával (ORCA Flash 4.0v3, Hamamatsu Photonics, Japán) végezzük. A csapdázó fókuszok egymástól független 3 dimenziós mozgatását egy saját fejlesztésű szoftver végzi, ami a súlyozott Gerchberg-Saxton algoritmussal [109], egy 960 CUDA magos, NVIDIA GPU-t használva (GeForce GTX 660), számolja ki és 16 ms-os képfrissítéssel jeleníti meg a szükséges fázistolás mintázatot az SLM felületén.

Tudományos eredményeim bemutatása

4. A TPP módszerének optimalizálása diffrakciós optikai elemekkel

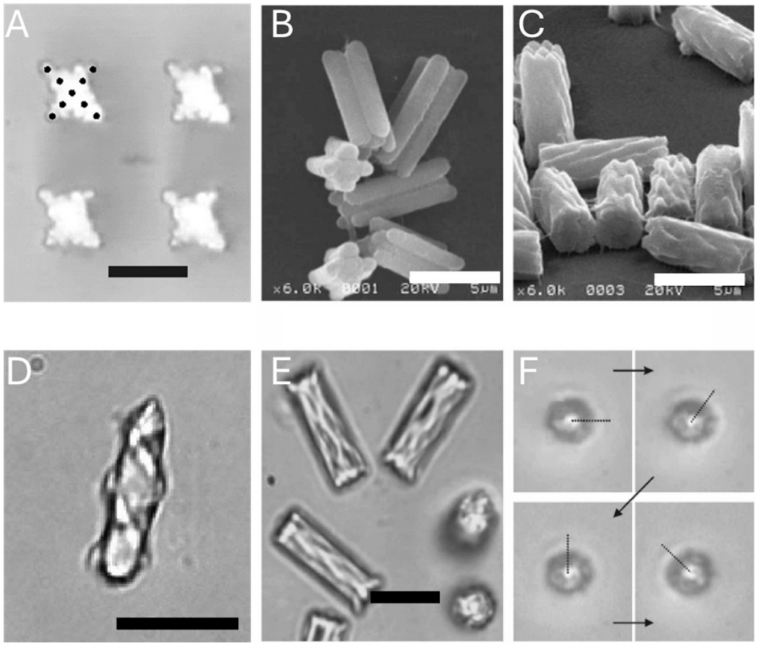
A kétfotonos polimerizáció (TPP) egyik legnagyobb hátrányaként szokás emlegetni, hogy pásztázáson alapuló módszer, és mint ilyen, vele szerkezeteket csak egymás után lehet elkészíteni, ami az időegység alatt elkészíthető szerkezetek számát korlátozza. Erre az egyik megoldási mód a pásztázás sebességének növelése a μm/s - mm/s tartományból a cm/s vagy akár a m/s tartományba is. Az ekkora sebesség eredményezte rövid megvilágítási idő mellett azonban az általánosan használt fotopolimerek nem szilárdulnak meg. Az iniciátorok kémiai módosításával megnövelhető azok kétfotonos hatáskeresztmetszete akár 1000 GM fölé is, ami már lehetővé teszi a jelentősen magasabb pásztázási sebességet [110, 111]. Emellett a folyamat párhuzamosításával szintén lehet növelni a módszer hatékonyságát, amit polimerizáló nyaláb megtöbbszörözésével lehet elérni. A legkorábbi publikációkban [7, 53, 100] minden egyes nyalábbal egy-egy különálló szerkezeteket polimerizáltak, holott a módszer alkalmas arra is, hogy egyetlen összetett 3D alakzatot több nyaláb koordinált mozgatásával lehessen előállítani, ahogy azt a 4.1 fejezetben saját eredményként bemutatom.

A TPP egyik gyakori elrendezése az, amikor üveg hordozóra felvitt rétegbe polimerizálunk olajimmerziós objektívvel az üvegen keresztül. Ekkor azonban a nagy NA-val rendelkező objektívek csak a hordozó fölötti néhány mikrométeres tartományban képesek jelentősebb aberráció nélkül lefókuszálni a polimerizáló nyalábot. Ha egy 10-20 μm-nél magasabb szerkezetet akarunk előállítani, az üvegtől távolabb a fókusz és ezzel együtt a voxel is már jelentősen megnyúlik, helyzete eltolódik, eltorzítva a polimerizált szerkezetek alakját. A 4.2 fejezetben megmutatom, hogy az ilyen elrendezésben SLM-mel módosított nyalábbal a fókusz torzulása és eltolódása jelentősen csökkenthető.

4.1. A TPP módszerének párhuzamosítása

A TPP párhuzamosításának több, koordináltan mozgatott nyalábot alkalmazó módját mutattam be diffraktív optikai elemek felhasználásával [8]. A nyalábtöbbszörözést egy olcsó, műanyag, a nyaláb keresztmetszetében rögzített mintázatú fázistolást létrehozó elemmel (kinoform), valamint egy SLM-mel valósítottam meg. Két kinoformot használtam, amelyeken olyan fázismintázat volt, ami a kb. 5 mm-re kitágított nyalábot 5, illetve 9 nyalábra osztotta, kereszt alakban eltérítve azokat (16. ábra A). A nyalábokat egy 4f optikai rendszerrel és a mikroszkóp objektívvel a mintába képezve a polimerizáló fókuszok kereszt alakban helyezkedtek el, ahol a szomszédos fókuszok egymástól 1.3 μm távolságban voltak. A mintát

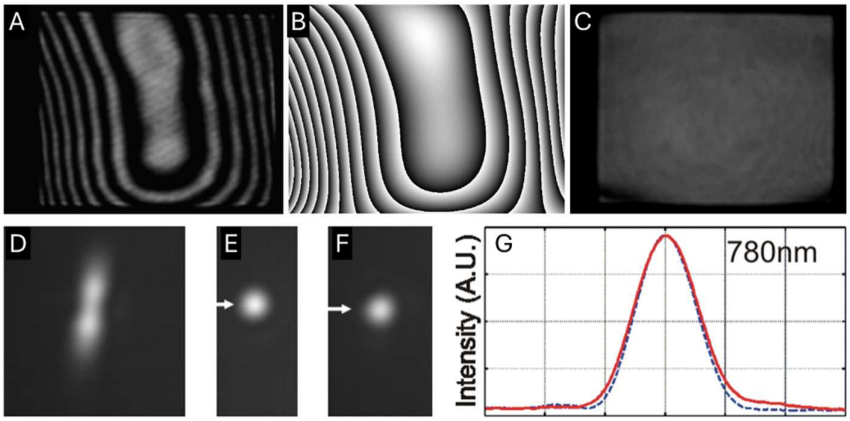
ezután egyszerűen az optikai tengely irányába mozgatva az így elhelyezkedő fókuszok kereszt alakú rudakat polimerizáltak (16. ábra A, B). Amikor a kinoformot a minta mozgatása közben megforgattam, a fókuszpontok egy-egy, azonos középpontú körpályán mozogtak, ami helikális oszlopokat eredményezett (16. ábra C-F). A kereszt méretét a 4f elrendezés méretezésével lehetett állítani, a helikális oszlopok „menetemelkedését” pedig a mintamozgatás és a forgatás sebességének arányával. A rögzített eltérítés-mintázatot létrehozó kinoform alkalmazásának hátránya, hogy a nyalábok számának módosítása csak a kinoform cseréjével lehetséges, és a távolságuk is csak az optikai rendszer átépítésével módosítható.



16. ábra. Kinoformmal és SLM-mel polimerizált helikális szerkezetek. A: 9 nyalábot létrehozó kinoformmal polimerizált, kereszt alapú oszlop képe, ahol a 9 fókusz helyét fekete pontok jelzik. B, C: 5 nyalábot létrehozó SLM-mel polimerizált hengerek elektronmikroszkópos képei (B egyenes, C helikális). 9 nyalábos kinoformmal (D) és 5 nyalábos SLM-mel (E) létrehozott helikális oszlopok képei. F: Csapdázott helikális oszlop képei forgás közben. A szaggatott vonal a henger azonos pontját jelzi az egymás utáni felvételeken. A méretskála mindenhol 5 μm.

A fókuszok száma, elrendezése és távolsága sokkal egyszerűbben állítható az SLM segítségével, mivel annak felületén a fázistolást létrehozó mintázat szabadon és akár polimerizáció közben is változtatható. Párhuzamos, függőleges oszlopokból álló teszt struktúrákat készítettem, ahol az egyes szerkezetekben a fókuszok távolsága rendre 1 μm, 1.3 μm és 1.7 μm volt. A többszörözött fókuszokat létrehozó fázismintázatokat az SLM gyári szoftverével állítottam elő, melyeket aztán szürkeskálás képként jelentettem meg az SLM felületén, mint egy másodlagos képernyőn. A polimerizációs kísérletek azt mutatták, hogy az

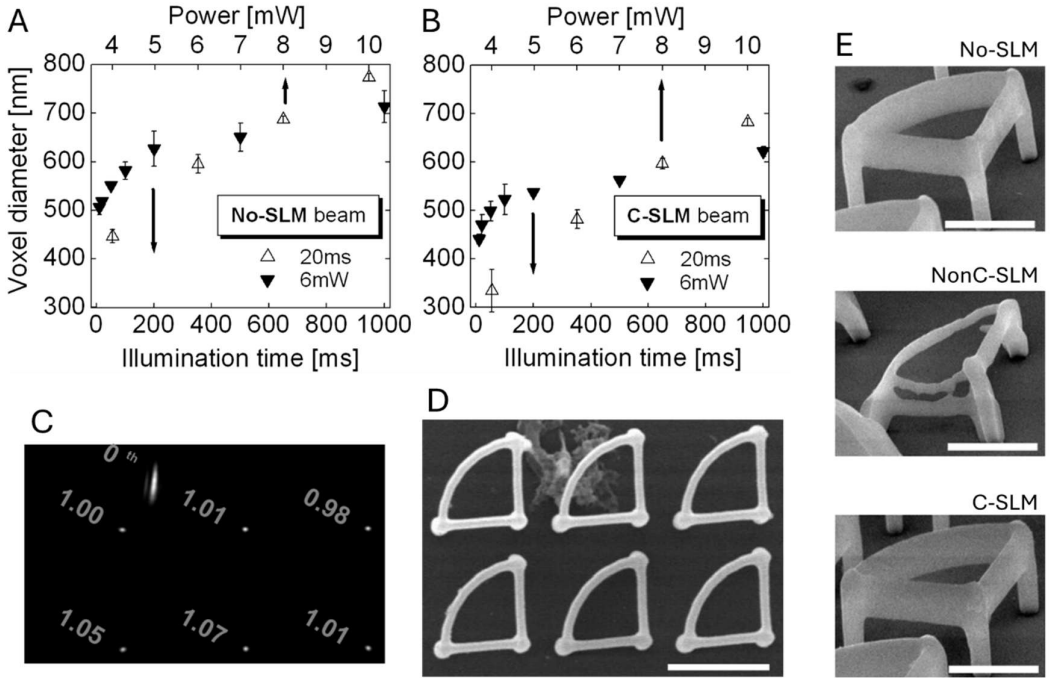
1.7 μm távolságnál (az adott teljesítmény és sebesség mellett) az egyes rudak már különállóan polimerizálódtak. Ezért 1.25 μm fókuszpont távolságot választva készítettem a kinoformos kísérlethez hasonlóan helikális oszlopokat (16. ábra C, E). Ehhez a minta optikai tengely menti mozgatásával szinkronizáltan, egy animált grafikus file megjelenítésével léptettem az SLM-en megjelenő fázismintázatot, ami a polimerizáló fókuszok optikai tengely körüli keringését eredményezték. Mind a kinoformmal, mind az SLM-mel polimerizált helikális rudakat optikai csipesszel meg lehet ragadni, ahol azok hossztengelyükkel az optikai tengely irányába állnak be, és helikális alakjuknak köszönhetően, a róluk szóródó fény által kifejtett forgatónyomaték miatt forgásba jönnek. Megmutattam tehát, hogy korábban több útvonal menti pásztázással polimerizálható szerkezeteket egyetlen eltolással is elő lehet állítani.



17. ábra. Az SLM felületi görbülete kompenzációja. A: Michelson interferométerrel kapott interferogram 532 nm-es lézert használva. B: Az előkompenzációt létrehozó fázistolás mintázat. C: A korrekció után mért interferogram 532 nm-en. D: a korrigálatlan 780 nm-es nyaláb fókusza. E: SLM nélküli 780 nm-es nyaláb fókusza. F: SLM-mel korrigált 780 nm-es nyaláb fókusza. G: Intenzitás értékek az E (szaggatott vonal) és F (folytonos vonal) fókuszokban a nyíl irányában.

Az SLM alkalmazásának a nyaláb alakításában van azonban egy technikai jellegű problémája: a gyártásból adódóan ezen eszközök reflektáló felülete nem teljesen sík, ezért a róluk visszaverődő nyaláb torzulást szenved. A görbület nagysága a cm-es tartományba eső méretű felületen csupán néhány mikrométer, ez azonban elég ahhoz, hogy az SLM-ről visszaverődő, lefókuszált nyaláb a fókuszban messze nem lesz diffrakciólimitált. A problémát azonban pontosan az SLM fázismódosító tulajdonsága segítségével lehet orvosolni: ha ismert az SLM felületének görbesége, akkor egy ugyanakkora amplitúdójú, de ellentétes előjelű fázistolás mintázattal (hologrammal) a nyaláb torzulása előkompenzálható, így az eszköz

felületét ismét síkhullám hagyhatja el. A fókuszfolt torzulása a mi esetünkben gyakorlatilag egy asztigmia-szerű foltot eredményezett (17. ábra D) két jól elkülöníthető fókuszsíkkal.

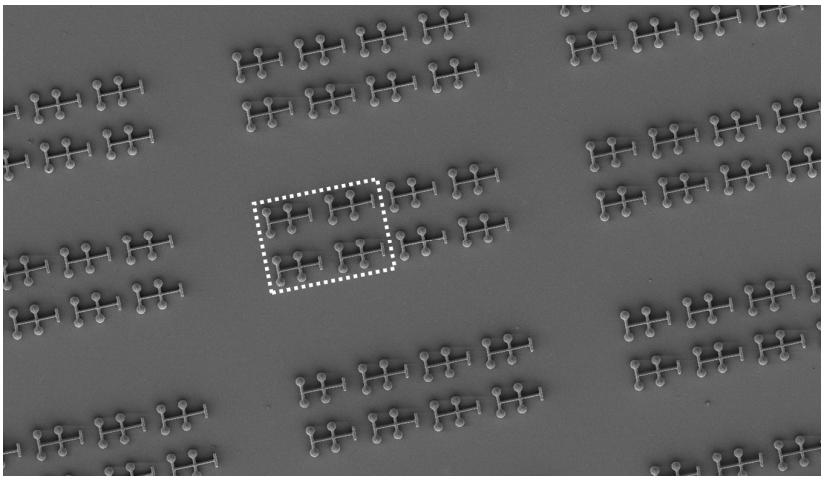


18. ábra. Az SLM-es kompenzáció hatásai. A: SLM-et nem használó polimerizációval készített voxelek átmérői 20 ms megvilágítási idő mellett különböző teljesítményeken (nyitott háromszög) és 6 mW teljesítmény mellett különböző megvilágítási időknél (zárt háromszög). B: Korrigált SLM-mel polimerizált voxelek átmérői (ugyanazon paraméterek, mint az A panelen). C: A korrigált SLM-mel előállított 6 polimerizáló fókusz képei, jelölve azok relatív intenzitásait. A 0^{th}-val jelölt nulladik rendű nyaláb mutatja az eredeti, nem korrigált intenzitás-eloszlást a fókuszban. D: A C panelen bemutatott, a korrigált SLM-mel megtöbbszörözött nyalábbal polimerizált teszt alakzatok elektronmikroszkópos képei. Méretskála: 10 μm. E: SLM nélkül, nem korrigált SLM-mel és korrigált SLM-mel, 6 mW teljesítménnyel és 4 μm/s sebességgel készített teszt alakzatok elektronmikroszkópos képei. Méretskála: 5 μm.

Az előkompenzációra kidolgoztunk egy módszert, és megmutattuk, hogy a fókusz ismét szinte teljesen diffrakció limitált lesz, valamint, hogy a torzult nyaláb okozta polimerizált szerkezetek deformációja is megszüntethető [108]. Első lépésként az SLM felületének görbületét mértük meg, amihez egy Michelson interferométert építettünk 532 nm-es mérő hullámhosszal. Ennek egyik karjában a visszaverő tükör az SLM felülete volt, a másikban pedig egy síktükör. A mérés során az SLM felületén minden pixelre azonos fázistolás értéket adtunk, és így rögzítettük a két visszavert nyaláb interferenciáját. Az SLM görbületéből adódó torzulás jól mérhető volt a megfigyelt interferencia mintázattal (17. ábra A), és valóban egy hengerfelület-szerű fázistolás mintázattal volt jellemezhető, ami az asztigmia-szerű torzulás esetén várható. Az intenzitás mintázatot először magasság értékekké konvertáltuk az

interferométert kivilágító lézer hullámhosszának ismeretében, ami lényegében a felület tényleges görbeségét adta meg. Azt tapasztaltuk, hogy az SLM kijelzőjének síkja a közepén kb. 2.9 μm-rel tér el a sík felülettől. A felület pontos ismeretében bármely hullámhosszra ki lehet számolni a korrekciós hologramot (17. ábra B), amelyet aztán az SLM vezérlő programja az eszköz felületén megjelenít. Két különböző hullámhosszon (532 nm és 780 nm) ismét megfigyelve az interferogramot, azt láttuk, hogy az SLM-et elhagyó nyaláb hullámfrontja gyakorlatilag sík lett mindkét esetben (17. ábra C).

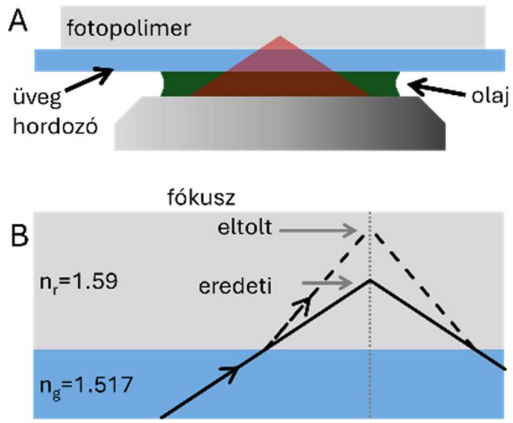
Ahhoz, hogy SLM-mel megtöbbszörözött nyalábbal torzulásmentesen polimerizálhassunk, a nyalábokat létrehozó hologramot kombináltuk a korrekciós hologrammal. A korrekciós eljárás eredményességét többféleképpen is jellemeztük. A fókuszfolt alakjául az asztigmiás fókuszvonalak helyett szabályos fókuszfoltot kaptunk (17. ábra F), ennek következtében a voxelek alakja is ismét torzulásmentes ellipszoid lett, hasonlóan az SLM nélkül készült voxelekéhez, átmérőjük azokénál azonban kb. 10%-kal kisebb (18. ábra A, B). A korrigált SLM-mel készült szerkezetek alakja a nem korrigálttal készítettekétől eltérően szinte megkülönböztethetetlen az SLM nélkül készült szerkezetekétől (18. ábra E). Továbbá, az SLM-mel megtöbbszörözött nyalábok teljesítménye egy példaként létrehozott 2x3-as mintázatban ±5%-on belüli azonos volt (18. ábra C), a velük készített szerkezetek pedig megkülönböztethetetlenek egymástól (18. ábra D), ami mutatja, hogy a módszer teljesen alkalmas egyedi szerkezetek párhuzamos módon történő polimerizációjára. A polimerizáló nyaláb korrekciós hologrammal kiegészített megtöbbszörözését laborunkban azóta is rutinszerűen alkalmazzuk (19. ábra), ami jelentős időmegtakarítást eredményez.



19. ábra. SLM-mel létrehozott 4 nyalábbal párhuzamosan polimerizált sejtmanipulátor szerkezetek elektronmikroszkópos képe. A bekeretezett szerkezetek készültek egyidőben.

4.2. Korrekció vastag SU-8 rétegbe való polimerizáció esetén

A kétfotonos polimerizáció egyik legelterjedtebb optikai elrendezése az, amikor átlátszó (üveg vagy kvarc) hordozóra felvitt nagy viszkozitású, sűrű folyadék polimerbe, vagy szilárd rétegbe polimerizálnak a hordozón keresztüli megvilágítással (20. ábra A). Emellett a legnagyobb részletgazdagság eléréséhez nagy (1.2-1.45) NA-jú olajimmerziós objektívvel fókuszálják le a polimerizáló nyalábot. Ebben az optikai elrendezésben az objektívból való kilépés után a nagy numerikus apertúrával lefókuszált nyalábnak az immerziós olajon, a hordozón és a polimer rétegen, vagyis három, optikailag kissé eltérő közegen kell keresztülhaladnia. Sajnos ennek az elrendezésnek számos nyilvánvaló előnye mellett az a hátránya, hogy a fotopolimer és az üveg eltérő törésmutatója (1.54-1.6 vs. 1.52) miatt a polimerizáló fókuszfolt alakja az üvegtől távolodva egyre inkább eltorzul, illetve el is tolódik az eredeti pozíciójához képest (20. ábra B). Az okozott nyalábtorzulást a több optikai rétegen való áthaladás eredményezte szférikus aberrációval lehet leírni [112]. Az SU-8 fotopolimer és az általunk leggyakrabban használt fedőlemez (Menzel-Glaser), mint hordozó esetében a polimerizáló hullámhosszon (785nm) a törésmutatók rendre 1.59 és 1.517. Az irodalomban lézeres ablációs eljárás során már alkalmaztak egy előkompenzációs módszert, ahol a megvilágító lézer fázisfrontját a torzulást okozó aberrációval ellentétes előjelű szférikus aberrációval módosították [112]. Ezen az elven működő előkompenzációt valósítottunk meg mi is a TPP optikai rendszerünkben [113] méghozzá ismét az SLM fázismódosító képességét kihasználva: a polimerizáló nyalábot az SLM-ről visszaveretve annak fázisfrontját egy szférikus aberrációt létrehozó hologrammal módosítottuk, ahol a módosítás mértéke ráadásul változott a fókusznak az üvegtől való távolságával.



20. ábra. A minta és az objektív elhelyezkedése a TPP rendszerünkben. Az üveg hordozón keresztül megvilágított fotopolimerben (A) a fókusz eltolódik (B) és eltorzul. A nagyobb törésmutató az SU-8 fotopolimeré, a kisebb az üveg hordozóé 785 nm hullámhosszon.

A fókuszban az elektromágneses teret jellemző dimenzió nélküli V mennyiség leírható az SLM egyes pixeleiről érkező hullámok összegeként, ami egyetlen fókuszpont esetében a következő:

$$V = \sum_{j=1,N} \frac{1}{N} e^{i\Delta_j} \tag{6}$$

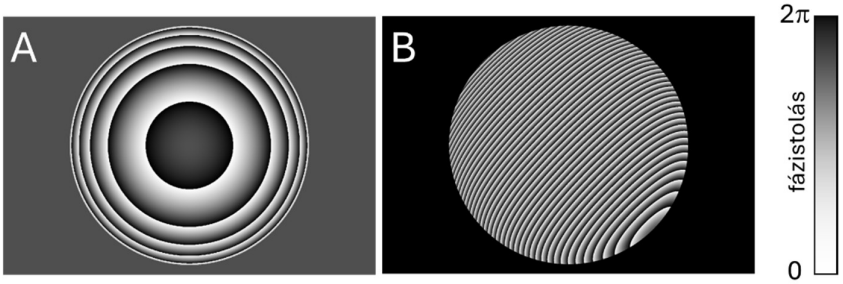
ahol N az SLM pixeleinek száma, Δ_j pedig a j -dik pixel fázistolása. A korrekcióhoz felhasznált fázistolás mintázat (21. ábra B) két hologram összegeként állt elő: az egyik eltérítette a nyalábot az eredeti irányból ((7) egyenlet első tag), a második pedig bevezette a szférikus aberráció korrekciót ((7) egyenlet második tag, ill. 21. ábra A). Az SLM (x, y) koordinátájú pixelén megjelenő $\Delta(x, y)$ fázistolás ezért a következő alakot veszi fel:

$$\Delta(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda_0 f}(x\hat{x} + y\hat{y}) + \hat{z}SA(x, y), \tag{7}$$

ahol λ_0 a polimerizáló hullámhossz, f az objektív fókusztávolsága, ($\hat{x}$, $\hat{y}$) a fókuszfolt laterális eltérítése a mintatérben az optikai tengelyhez képest (esetünkben 10 μm mindkét koordináta tengely irányában). Látható, hogy a szférikus aberrációt meghatározó tag egy $\hat{z}$ számmal van megszorozva, ami egyszerűen a fókusznak az üveg felület feletti pozíciója. A szférikus aberrációt leíró egyenlet a következő:

$$SA(r) = -\frac{2\pi}{\lambda_0 f}\left[\sqrt{f^2 n_2^2 - r^2} - \sqrt{f^2 n_1^2 - r^2}\right]. \tag{8}$$

ahol $r = \sqrt{(x^2 + y^2)}$ az optikai tengelytől való távolság, n_1 és n_2 pedig a hordozó üveg és a fotopolimer törésmutatói (n_1 = 1.517, n_2 = 1.59). Ez a kifejezés a fókusz torzulását, valamint annak axiális eltolódását is korrigálja.

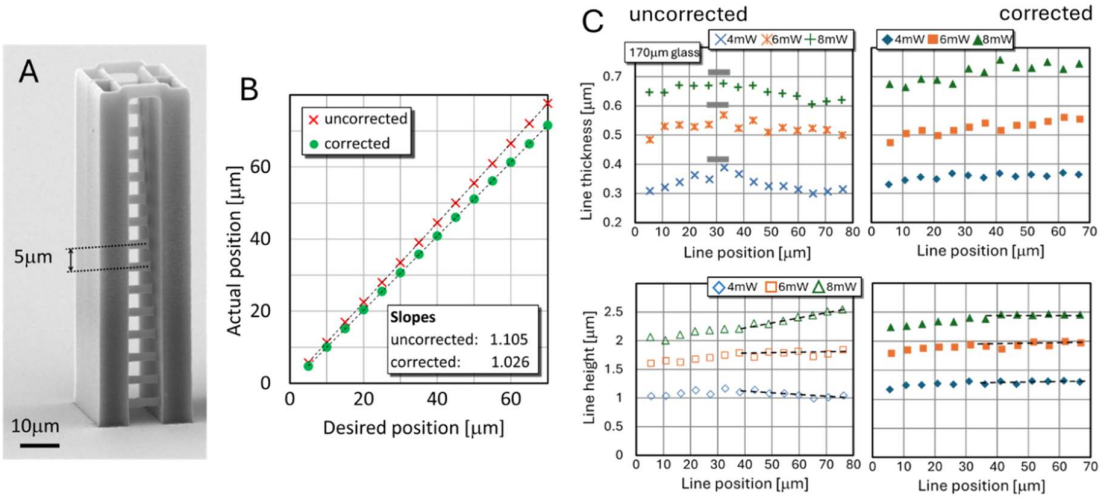


21. ábra. A fókuszfolt torzulást és eltolódást előkompenzáló hologram szürkeskálás ábrázolása. A szférikus aberrációt és fókusztolást (ebben az esetben a $\hat{z}_m$ = 70 μm értékénél) létrehozó taghoz (A) egy laterális eltolást létrehozó tagot hozzáadva kaptuk meg a kísérletben alkalmazott hologramot (B).

A fókuszfolt optikai tengely irányú eltolódását és a polimerizált szerkezetek torzulását 10 μm hosszú, vízszintes tesztvonalakkal szemléltettem, melyeket két megfelelően masszív

tartószerkezet közé polimerizáltam az üveg felületétől 70 µm-es magasságig 5 µm-es lépésközökkel, három különböző lézerteljesítményt használva (22. ábra A). Minden teszt mintázatot három különböző vastagságú hordozó üvegen készítettem el (100 µm, 145 µm és 170 µm). A torzulás és a kompenzáció jellemzéséhez megmértem a vonalak tényleges távolságát a hordozótól, valamint azok vastagságát és magasságát.

A korrekció hatása mindhárom üvegvastagság esetében hasonló volt, így csak a 170 µm vastag esetet mutatom be kvantitatívan. A polimerizáló rendszerünkben használt, NA=1.25 olajimmerziós objektívvel azt találtam, hogy korrekció nélkül a fókusz pozíciójának axiális eltolódása a 170 µm-es hordozónál több, mint 10% (22. ábra B). Ezt az előkompenzációval 2.6 %-ra tudtam csökkenteni. A tesztvonalak vastagsága korrekció nélkül minden esetben az üveg felett 30 µm és 60 µm közötti magasságban maximumot mutatott (22. ábra C). Korrekcióval ez a maximum eltűnt, és a vastagság érték kisebb, bár nem eltűnő változást mutatott az üveg feletti pozícióval, szintén minden paraméter mellett.



22. ábra. Vastag SU-8 rétegbe polimerizált tesztvonalak. A: A szférikus aberrációval korrigált eljárással, vastag tartóoszlopok közé polimerizált tesztvonalak elektronmikroszkópos képe. B: A tesztvonalak középvonalának tényleges távolsága az üveg hordozótól a tervezett távolság függvényében a korrigálatlan és a korrigált esetben. Az ábra a fókuszeltolódás korrekcióját mutatja. C: A tesztvonalak vastagsága és magassága az üvegtől való távolság függvényében, különböző lézerteljesítményeknél, a korrigált és a korrigálatlan esetekben.

A vastagsággal ellentétben a tesztvonalak magassága más-más trend szerint változott a hordozó feletti magassággal az alkalmazott lézerteljesítménytől függően. Kis magasságokban (30 µm-ig) minden esetben növekedett a magasság, amely trend 8 mW lézerteljesítmény esetében meg is maradt a teljes 70 µm-es tartományon. Ezzel szemben a 6 mW teljesítménnyel polimerizált vonalak magassága nem nőtt tovább, a 4 mW-osak pedig 50 µm fölött egyenesen

csökkenésbe kezdtek (22. ábra C). Az előkompenzáció ezt a három különböző trendet megszüntette, és a kompenzált SLM-mel készített vonalak magassága ugyanúgy viselkedett: 50 μm-ig enyhén nőtt, afölött pedig egy állandó értéket vett fel. A kis magasságokban megfigyelt vastagság és magasság változásnak a kompenzációra való érzéketlenségét nem vizsgáltuk kísérleti úton, de elképzelhető, hogy az üveg 1.517-es és az immerziós olaj 1.509-es törésmutatói különbségének tudható be. Ezzel együtt elmondható, hogy a több, eltérő törésmutatójú párhuzamos közegen áthaladó, erősen fókuszált nyalábbal történő polimerizáció esetében megfigyelt fókuszfolt eltolódást és vonalméret változást az SLM felületére adott szférikus aberrációt leíró fázistolással ha nem is sikerült teljes mértékben megszüntetni, de sikerült olyan mértékben csökkenteni, amivel a szubsztráttól több tíz mikrométeres távolságban is elfogadható minőségű struktúrák készíthetők. Ennek a gyakorlatban való alkalmazását egyébként az 6.3 fejezetben bemutatott 70 μm magas szerkezetek jól demonstrálják.

4.3. Összegzés

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 méretei, mint például helikális szerkezetek menetemelkedése a módszerrel kontrollált módon változtathatók. Megmutattam, hogy a helikális mikroszerkezetek optikai csipesszel csapdázhatók és ellenőrzött módon forgásba hozhatók.

2. Megmutattam, hogy az SLM-nek, mint a TPP párhuzamosításában használt diffraktív optikai elemnek a gyártási tökéletlenség miatti felszíni görbülete megfelelő fázistolás mintázattal kompenzálható. Ennek során az SLM felszínét az egyik tükörnek felhasználva, Michelson interferométer segítségével meghatároztam annak egy sík felülettől való eltérését. Ennek az eltérésnek az ismeretében kiszámoltam a polimerizációhoz használt 785 nm hullámhosszhoz legalkalmasabb korrekciós hologramot, és igazoltam, hogy azt alkalmazva az SLM felületét síkhullám hagyja el. Alkalmasan választott teszt szerkezeteket polimerizálva megmutattam, hogy a korrekció a tér mindhárom irányában megszünteti a TPP-vel készített szerkezetek deformitását.

3. A hordozótól eltérő törésmutatójú, vastag polimer rétegbe történő fókuszálás miatt előálló fókuszeltolódás és fókuszfolt 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 hologrammal. A korrekciós hologramban a szférikus aberráció tagot az üveg-fotopolimer határfelülettől való távolsággal növekvő súllyal vettem figyelembe. 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.

Releváns publikációk

Kelemen, L. et al. OPTICS EXPRESS 15:14488-14497 (2007)
Kelemen, L. et al. J. EUR. OPT. SOC.-RAPID PUBL. 6:11029 (2011)
Horvath, B. et al. MICROMACHINES 8:219 (2017)

5. Fénnyel hajtott mikromechanikai rendszerek.

A TPP-vel készített mikroszerkezetek egyik legkézenfekvőbb alkalmazási területe, elsősorban méretükből adódóan a mikrofluidikai rendszerekben való felhasználás, ahol integrált elemként látnak el valamilyen specifikus feladatot. A passzív, szűrőként [102, 114, 115] esteleg keverőként [116-118] működő szerkezetek mellett az aktív, mozgó eszközök [81, 84-86, 119, 120] az alkalmazások igén széles tárát nyitják meg. A mozgó mikromechanikai eszközök meghajtását elérték már mágnesesen, akusztikusan és természetesen fénnyel való megvilágítással is. A mozgó mikroeszközök kiválóan alkalmasak a mikrovilágban megfigyelhető jelenségek kontrollált körülmények melletti vizsgálatára, modellezésére, mivel ezek alakja, mérete, egyéb fiziko-kémiai tulajdonságai pontosan definiálhatók. Ebben a fejezetben fénnyel hajtott, általunk valamilyen jelenség modellrendszereként használt mikromechanikai eszközöket mutatok be.

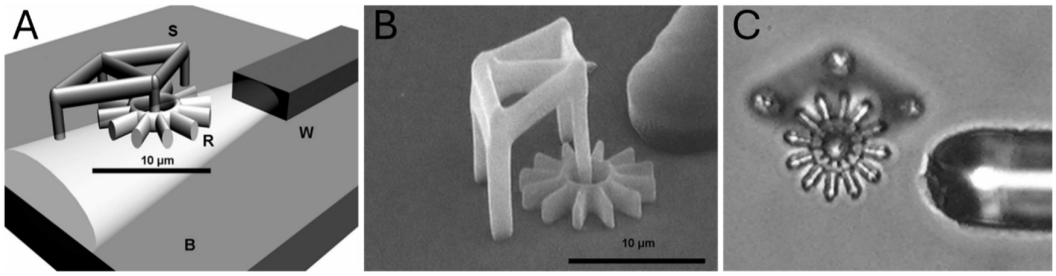
Az eszközök fénnyel történő meghajtása a fény hordozta impulzusnak fénytörés vagy visszaverődés során bekövetkező megváltozását használja ki (az elnyelést annak hátrányos termikus hatása miatt nem érdemes erre a célra felhasználni). Az impulzusváltozás nyomán fellépő erő, ami mozgásba hozza a mikroeszközt, tipikusan a pikonewtonos erőtartományba esik. Ezek a mikroeszközök potenciálisan akár összetett mikromechanikai rendszerek meghajtó egységeiként is szolgálhatnak. A következőkben bemutatott mikromechanikai rendszereink vagy egy (közel) párhuzamos nyalábbal történő kivilágítással, fényvisszaverődés révén jönnek mozgásba, vagy pedig a fénytörésen alapuló lézercsipeszt használtuk erre.

5.1. Fényvisszaverődéssel mozgatott mikroszerkezetek

5.1.1. Felületre integrált optikai motor

Galajda Péter és Ormos Pál az évezred elején nagy nemzetközi visszhangot kiváltó munkájukban optikai csipesszel tartott és forgómozgást végző mikro-hélixeket készítettek, melyeket jól kontrollált sebességgel tudtak forgatni [6]. Az eszköz potenciálisan a fényenergiának a mikromechanikai rendszereket meghajtó forgómozgássá való közvetlen átalakítását teszi lehetővé. Ezt az eszközt gondoltuk tovább oly módon, hogy se a forgó alkatrész megtartásához, se annak forgatásához ne kelljen optikai csipeszt használni [121]. Ehelyett a forgó alkatrészt egy szilárd hordozóra rögzített tengely tartja, a fényforrás pedig egy mellé integrált fényvezető szál (23. ábra A). A fényvezető szál egyik végébe becsatolt fény a másik, forgó alkatrész közelébe helyezett szálvégen kilépve aszimmetrikus módon

megvilágítja a fogórészt és visszaverődés révén impulzust ad át neki. A visszaverő felület az n=1.63 törésmutatójú fotopolimer és az eszközt körülvevő víz (n=1.33) határfelülete. A kialakítás előnye, hogy a fénynek a fényvezetőbe való becsatolása után a rendszer teljesen hordozható, mivel az alkatrészek egymáshoz képest rögzített helyzetben vannak, ugyanarra az üveg felületre integrálva. Mind a forgó elemet, mind a fényvezető szálat lézeres direkt írással lehet elkészíteni egy-egy lépésben.



23. ábra. Felületre integrált mikromotor. A: A mozgás koncepciójának bemutatása. B: Az elkészült mikromotor és a mellé integrált fényvezető elektronmikroszkópos képe. C: A motor-fényvezető páros optikai mikroszkópos képe.

A megvalósított eszköz (23. ábra B, C) az alábbi két lépésben készült el. Elsőként egy mikroszkóp fedőlemez hordozóra fényre polimerizálódó optikai ragasztó rétegbe UV lézeres megvilágítással polimerizáltunk kb. 10 µm széles, 5 µm magas és több milliméter hosszú fényvezető szálakat. A meg nem keményedett polimer leoldása után egy SU-8 réteget vittünk fel az üvegre, amibe aztán a fényvezető szálak egyik végéhez pontosan hozzáigazítva, TPP-vel elkészítettük a forgó alkatrészeket. Ez utóbbiak két részből álltak: egy tartószerkezetből, amelynek a tengely is része volt, és a tengely köré polimerizált forgórészből, ami egy 12 fogat tartalmazó, 10 µm átmérőjű kerék volt. A kerék forgatásához elegendő volt a szál végén kilépő fény 5-10 mW teljesítménye, amit külön méréssel határoztunk meg. A teljesítmény növelésével a forgás sebessége monoton nőtt, a maximálisan alkalmazott teljesítménynél 2 Hz fordulatszámot érve el.

A fény által a mikromotorra kifejtett nyomatékot két, egymástól független módszerrel számoltuk ki. Az elsőben, közvetlen módon a rotor lapátjainak felületéről visszaverődő fény impulzusváltozásából, a Fresnel formulák segítségével számoltuk ki a nyomatékot. Ismert volt a törésmutató különbség, a beesési szögek, valamint a felületek méretei és így a nyomaték $6.2*10^{-18}$ Nm ± $2.1*10^{-18}$ Nm-nek adódott a maximális intenzitás mellett. A második módszerben a megfigyelt mozgás alapján számoltuk ki a nyomatékot, ahol azt használtuk fel, hogy konstans forgási sebességnél a közegellenállásból származó nyomaték egyenlő a fény

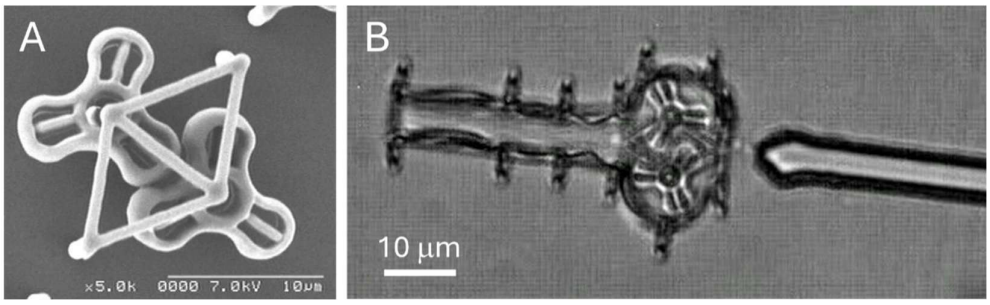
által kifejtett nyomatékkal. A közegellenállás kiszámításához a rotort egy olyan lapos hengerrel közelítettük, aminek a magassága a rotor magasságával (2 μm), sugara pedig annak sugarával egyezik meg, és a tengelye körül forog 2 Hz fordulatszámmal. A közelítésben az R sugarú és H magasságú henger alap- és fedőapjának dr széles gyűrűjén a folyadék nyíró ellenállása $dF_s = \tau \cdot 2 \cdot r \cdot \pi \cdot dr$ erőt fejt ki, palástjának egy $d\theta$ nyílásszögű felületén pedig $dF_p = \tau \cdot H \cdot R \cdot d\theta$ erőt, ahol τ a nyírófeszültség. A nyírófeszültség közelítésénél feltételeztük, hogy a henger felületén a folyadék sebessége a hengerével egyezik meg, ami egy h távolság után csökken 0-ra ($h = 2\,\mu m$). A nyírófeszültség $\tau = \mu \frac{dv}{dx}$ módon számolható ki, ahol μ a víz viszkozitása, $\frac{dv}{dx}$ pedig a folyadék sebességének csökkenése a felületre merőleges irányban. A nyírófeszültséget a $\tau = \mu \frac{r \cdot \omega}{h}$ értékkel közelítettem, ahol ω a szögsebesség. A τ behelyettesítésével azt kapjuk, hogy a henger sík lapjaira a

$$T_s = \int_0^R r \cdot dF_s = 2 \cdot \mu \frac{\omega \cdot \pi}{h} \int_0^R r^3 \cdot dr = R^2 \cdot \pi \cdot \frac{\mu \cdot \omega \cdot R^2}{2 \cdot h} \tag{9}$$

forgatónyomatékkal, annak palástjára pedig a

$$T_p = \int_0^{2\pi} R \cdot dF_p = 2 \cdot R \cdot \pi \cdot H \cdot \frac{\mu \cdot \omega \cdot R^2}{h} \tag{10}$$

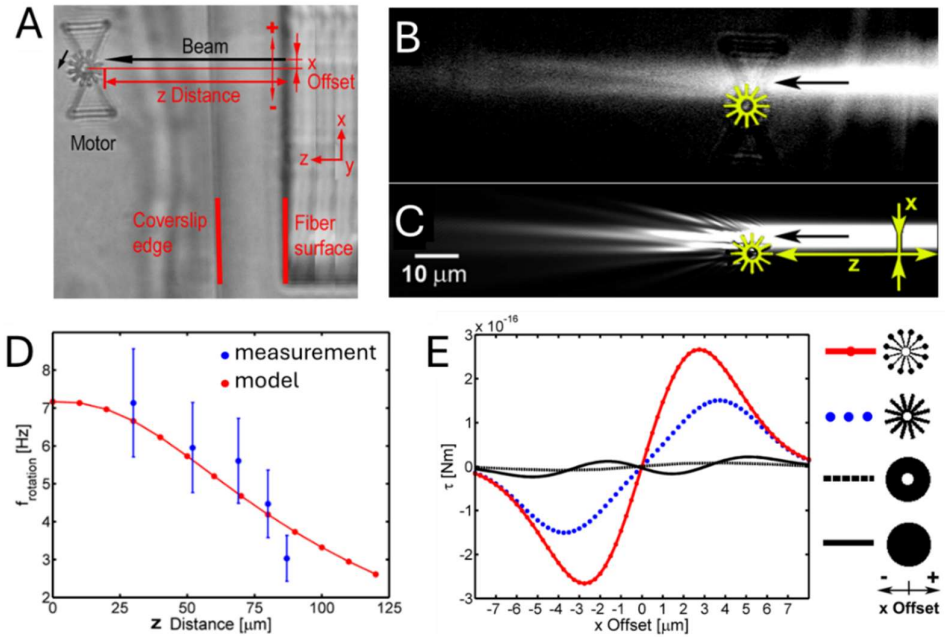
forgatónyomatékkal hat a viszkózus ellenállás. Az értékeket behelyettesítve a nyomatékot $19*10^{-18}$ Nm ± 20%-ra becsültük. Az alkalmazott közelítéseket tekintve ($h = 2\,\mu m$ és tömörnek tekintett henger) a két érték egyezése elfogadhatónak mondható.



24. ábra. A fénnyel történő forgatás tervezett alkalmazása. A: Egymásba illeszkedő mikropumpa elemek elektronmikroszkópos képe. B: Mikropumpa forgórészek folyadékcsatornába ágyazott változatának optikai mikroszkópos képe a mellé integrált fényvezető szállal.

A későbbiekben lépéseket tettünk afelé, hogy a mikromotort beépítsük valamilyen összetett mikromechanikai rendszerbe, ahol a motor annak fénnyel meghajtott erőforrásaként működött volna. Bár ezt az irányt nem vittük végig, nem publikált eredményeink szerint (24. ábra) a szerkezet mellé integrált fényvezetőből kilépő fénnyel való meghajtás alkalmasnak

tűnhet pl. mikroméretű folyadékpumpa működtetéséhez. A szerkezet elkészült változatában két, egymással összekapcsolódó kerék szerepelt, amelyek a forgódugattyús szivattyú elvén pumpáltak volna folyadékot. Az eszköz egyedisége abban rejlett, hogy vele pikoliter térfogatú folyadékot lehetett volna kontrolláltan pumpálni a meghajtó nyaláb intenzitásával változtatható sebességgel.

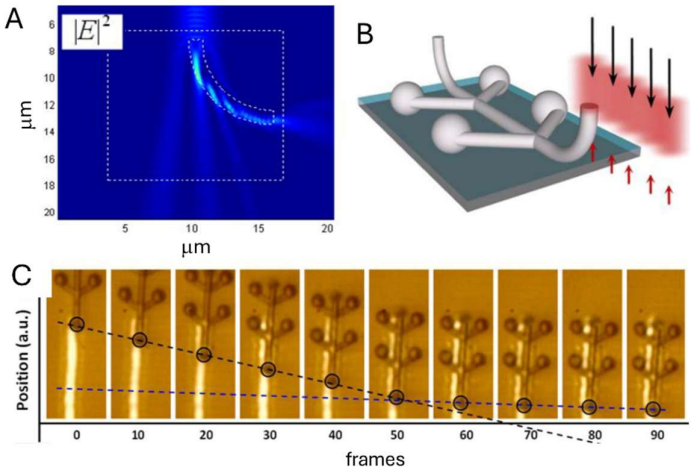


25. ábra. Mikromotorok modellezése. A: A motorok és a mellé illesztett fényvezető szál optikai mikroszkópos képe a változtatott pozícionálási paraméterekkel. A szálból kilépő és a kerékkel kölcsönható nyaláb megfigyelt (B) és modellezett (C) intenzitás eloszlásai. D: A forgás sebességének függése a fényvezető szál első felülete és a kerék közti távolságtól. E: A forgatónyomaték számolt függése a nyaláb optikai tengelye és a kerék tengely közti távolságtól különböző kerék alakok esetében.

A mikromotorok fénnyel való meghajtását egy nemzetközi kooperáció keretében sikerült modellezni, és javaslatot tenni nagyobb hatékonyságú kerék geometriára [122]. A modell azt a fenti kísérletben bemutatott helyzetet írja le, amikor egy fényvezető szálból kilépő, enyhén széttartó nyalábbal hajtjuk meg a mikromotort, ahol a változó paraméterek (25. ábra A) a motor geometriája, a szál kilépő felülete és a motor tengelye közti távolság („z Distance”), valamint a megvilágító nyaláb középvonala és a motor tengelye közti távolság („Offset”). A modell egy általunk polimerizált valós kerék digitalizált körvonalából indult ki, amit axiálisan *h* magasságig kiterjesztve kaptuk meg a kerék 3D modelljét. A modellben a motor térfogatában a törésmutató 1.59 (SU-8 fotopolimer) értéket kapott, azon kívül pedig 1.33-at (víz). Az így kapott teret kooperációs partnerünk véges számú elemre bontotta, és a paraxiális hullámegyenletet felhasználva kiszámolta egyrészt a megvilágító nyaláb intenzitás eloszlását

az inhomogén eloszlású törésmutató mezőben (25. ábra C), valamint minden egyes nagy törésmutatójú elemre a rá ható erőket. Végül ezeket az erőket felhasználva kiszámolta a rotorra ható teljes forgatónyomatékot. A számolások eredményét a kísérletekkel (25. ábra B) összehasonlítva jó egyezést kaptunk a kialakuló fordulatszámokat tekintve mind a motor-fényvezető távolságfüggésében (25. ábra D), mind az „Offset" függésében (25. ábra E). A modell továbbá alkalmas volt arra, hogy a kerék alakját optimalizáljuk a nagyobb nyomaték elérése érdekében. A nyomatéknak a forgástengely és megvilágító nyaláb optikai tengelyének távolságfüggéséből megállapítottuk, hogy alkalmas geometriai módosításokkal az általunk eredetileg készített motornál lehetséges jóval hatékonyabbat készíteni (25. ábra E, legfelső geometria).

5.1.2. Mozgatás mikroszerkezetbe csatolt fénnyel



26. ábra. Mozgatás mikroszerkezetbe csatolt fénnyel. A: A szerkezetbe csatol fény terjedésének modellezése FDTD módszerrel. B: A fény szerkezetbe csatolásának sémája. C: A becsatolt fénnyel történő mozgatás fénymikroszkópos felvételei. A fény a körrel jelölt végén lép be a szerkezetbe.

Az előző fejezetben bemutattam egy példát arra, hogyan lehetséges a fény reflexiójából adódó impulzusváltozást mikroszerkezetek kontrollált mozgatására használni. Egy további mikromechanikai rendszer fénnyel való mozgatásának újszerű módszerét vizsgáltuk meg elméleti és kísérleti megközelítéssel egy dán kooperáló partnerünkkel [123]. A vizsgált módszer mobil mikroeszközöknek egy szilárd hordozón történő mozgatására alkalmas, ahol a mozgató fény egy, a mozgás síkjára merőlegesen érkező enyhén fókuszált nyaláb. A mozgatáshoz szükséges impulzusátadás ebben az esetben a szerkezet részét képező fényvezető szál belső felületén történő közel teljes visszaverődés során valósul meg, mivel a fényvezető szál meg van hajlítva, így a beeső fény terjedési iránya benne 90 fokkal megváltozik (26. ábra

A). Ebben a munkában én a méréshez szükséges geometriájú szerkezetek tervezését és polimerizációját végeztem, míg partnerünk a fénnyel hajtott mozgatás méréseket és a modellszámításokat. A modellszámítások az időtartománybeli véges differencia módszerrel (finite-difference time-domain, FDTD) készültek.

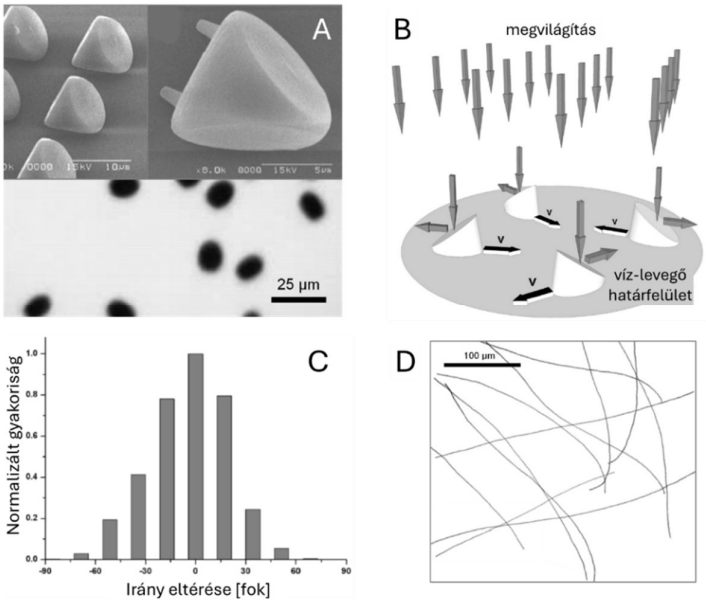
Az polimerizált modell rendszer egy 20 μm hosszú, 2 μm átmérőjű fényvezető szál volt, amely a két végén 8 μm-es görbületi sugárral egy negyed körívben végződött (26. ábra B). Az így keletkezett íves szál mindkét vége a mozgató fény terjedésével ellentétes irányba mutatott. A szálhoz még négy gömböt is polimerizáltunk, hogy az egész szerkezetet optikai csipesszel is lehessen mozgatni. A mérések során megmutattuk, hogy amíg a mozgató párhuzamos nyaláb csak a fényvezető szál egyik végén csatolódik be, a szerkezet saját hossztengelye irányában képes elmozdulni, és egészen addig mozog, amíg a másik íves végét is meg nem világítja a mozgató nyaláb (26. ábra C, 0-50 képkocka). Ebben az esetben ugyanis már a szerkezet mindkét, egymással szemben lévő íves szakaszában megtörténik a teljes visszaverődés, a két ellentétes erő kiegyenlíti egymást, a szerkezet pedig megáll (26. ábra C, 50-80 képkocka). A mozgás irányát egyedül a szál íves részének iránya szabta meg: a mozgás az íves szakasz síkjában történt. Bár ezzel a módszerrel a mozgatás csak egy dimenzióban lehetséges, a fény-mozgás konverzió hatékonyságára jellemző, hogy a fény becsatolása után a szerkezet akkor is mozgásba jött, amikor annak két gömbjét optikai csipesszel csapdáztuk, vagyis a teljes visszaverődésből származó erő nagyobb volt, mint a laterális csapdaerő.

5.1.3. Autonóm mozgó mikroszerkezet I: csúszó ék

Az önállóan mozgó mikro- vagy nanorészecskék már a 2000-es, 2010-es években is számos érdekes alkalmazással kecsegtettek, emiatt kutatásuk már akkor igen intenzív volt. A mikroszkopikus méretű rendszerek az önmagukban való alkalmazás mellet a makroszkopikus méretű egyedekkel rendelkező sokaság összetett, kollektív mozgásának mikroszkóp alatt való modellezésére is kiválóan alkalmasak lehetnek. Az ilyen sokaság egyedeinek legalapvetőbb jellemzője, hogy a meghajtás mechanizmusa mindegyikben rendelkezésre áll, és hogy az ehhez szükséges energiát a környezetüktől kapják. Az egyedek önálló mozgását többek között mechanikus meghajtással, kémiai reakciókkal, termikusan vagy elektromágneses térrel lehet elérni [124-126]. Ha olyan sok mikroszkopikus méretű egyedet készítünk és helyezünk egy viszonylag szűk területre, hogy azok mozgás közben egymással kölcsönhatnak, akkor ezzel a sokasággal a kollektív mozgást is lehet mikroméretekben kontrolláltan tanulmányozni. Maguk a szerkezetek természetesen számos módszerrel készülhetnek el, anyagukat és kialakításukat

az alkalmazási cél és a tervezett meghajtás mechanizmusa dönti el. Ezen módszerek egyike a kétfotonos polimerizáció, mivel ez tökéletesen alkalmas tetszőleges alakú 3D mikroszerkezetek nagy számban történő elkészítésére.

Autonóm mozgásra képes mikrorészecskéket készítettünk, amelyekkel azt vizsgáltuk meg, hogy egy homogén módon kivilágított mintatérben milyen mozgást lehet velük elérni. A részecskéket úgy terveztük, hogy a mozgáshoz szükséges energiát az őket megvilágító fényből, visszaverődés során bekövetkező impulzusátadással nyerjék. Ezt az alapkoncepciót kétféle geometriával vizsgáltuk úgy, hogy a mozgás mindkét esetben a fény terjedési irányára merőleges síkban történjen.



27. ábra. Az autonóm mozgást végző ékek. A: Az ékek elektron- (fent) és optikai mikroszkópos (lent) képei. B: A homogén megvilágítással történő mozgatás koncepciója. A szürke nyilak a megvilágító fényt, a feketék pedig a mozgás irányát mutatják. C: A szerkezetek elliptikus képeinek nagytengelye és a mozgásuk iránya közötti szög eloszlása. D: Néhány kiválasztott szerkezet mozgásának útvonala.

Az első ilyen vizsgált részecske egy 45 fokos nyílásszöggel rendelkező ék volt (27. ábra A) [127]. Ha az ék az egyik lapján fekszik a hordozó felületen, az erre a felületre felülről, merőlegesen érkező fény az ék felső lapjáról ebbe a síkba, tehát 90 fokos szöggel verődik vissza, és olyan irányú erőt fejt ki a részecskére, amelynek lesz a visszaverődés irányával ellentétes, a hordozó síkjába eső komponense is. Emiatt az ék a visszaverődéssel ellentétes irányba elmozdulhat (27. ábra B). A visszavert intenzitás maximalizálásához az ék lapjainak reflexióját annak fémmel történő bevonásával növeltük meg. A mozgás autonóm jellegét az

adta, hogy annak irányát csakis a test orientációja szabta meg, kívülről nem lehetett kontrollálni.

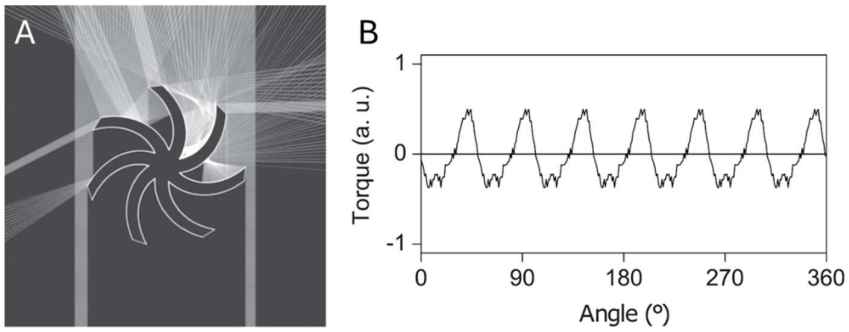
Az én feladatom ebben a projektben az ékek megtervezése, elkészítése és visszaverő képességük növelése volt. Az ékeket fedőlemez üveg hordozóra, álló helyzetben készítettem el, hogy a két visszaverő, 45 fokot bezáró oldalukat a reflexió növeléséhez felülről fémmel be lehessen vonni, de a többi részre csak minimális mennyiségű fém rakódjon le. Az ékek méretét az határozta meg, hogy mekkora az a legkisebb méretű, az üveg hordozó normálisával 22.5 fokot bezáró felület, amit a TPP voxelméretét figyelembe véve megfelelően síkra el lehet készíteni. Magasságuk ezen megszorítás mellett 11 μm lett, szélességük pedig 9 μm. A polimerizáció és előhívás után az ékek felszínére kb. 200 nm, a megvilágító fény hullámhosszán (1070 nm) erősen reflektáló arany réteget vittem fel katódporlasztással. Ezután mechanikusan eltávolítva a hordozóról, egy tárgylemezre cseppentett vízcseppbe pipettáztam őket úgy, hogy a vízcsepp függött a tárgylemez alatt. Így az ékek a csepp aljára gyűltek, és víz-levegő határfelületen gyakorlatilag súrlódás nélkül tudtak mozogni. A csepp alja a mikroszkóp látómezejének méretében sík felületűnek volt tekinthető. A fényvisszaverő felület, amikor az ékek már a víz-levegő határfelületen feküdtek, felülnézetben egy kissé ellipszis alakú volt, a szerkezetek képei pedig ilyen alakú sötét foltokként jelentek meg a mintatérben. Ennek azért volt jelentősége, mert ennek az ellipszisnek a nagytengelye mutatta a fény visszaverődésének irányát. A szerkezet mozgásának egyik legfontosabb jellemzője pedig a visszaverődés irányának és a kialakult mozgás irányának a relációja volt.

A kollégáim által elvégzett, kiértékelt és értelmezett kísérletek tanúsága szerint az ékek, bár kis számuk miatt kollektív mozgást nem végeztek, autonóm mozgást viszont igen: haladási irányuk kis szórással jól megegyezett az ellipszis alakjuk hossztengelyének irányával (27. ábra C), vagyis valóban egyedül az orientációjuk által meghatározott volt. Ez az irány ráadásul csak igen kismértékben változott, mivel a mozgás perzisztencia hossza az ékek méreténél több, mint tízszer nagyobb, átlagosan 355 μm volt (27. ábra D).

5.1.4. Autonóm mozgó mikroszerkezet II: gördülő henger

A másik, hasonlóan autonóm módon mozgó szerkezettel eredetileg az volt a célunk, hogy a csúszó ékekkel ellentétben ezek szilárd felületen is képesek legyenek mozogni. Ezért egy jelentősen kisebb súrlódási ellenállással rendelkező gördülő mozgáson alapuló eszközt készítettünk [128]. Ennek a szerkezetnek szintén a tervezését, az elkészítését és a fémmel történő bevonását végeztem én, a fény útjának sugároptikai modellezést és a gördülési

kísérleteket pedig kollégáim. A szerkezetet egy henger alakú burkolófelülettel ellátott testként képzeltük el, ami a szilárd hordozó felületen a palástján gördül, miközben a hordozóra merőleges irányból homogén intenzitás eloszlású fénnyel megvilágítjuk. A forgatáshoz szükséges nyomatékot a mikrohenger strukturált felületéről visszaverődő fény impulzusváltozása biztosította. Az első kísérleteket olyan, prizma típusú hengerekkel végeztük, amelyeknek a keresztmetszete a hossztengely mentén állandó alakú és helyzetű 2D poligon (erre példa a 28. ábra A). Itt az elv hasonló volt, mint a szél mozgására merőleges tengelyű szélkeréké.

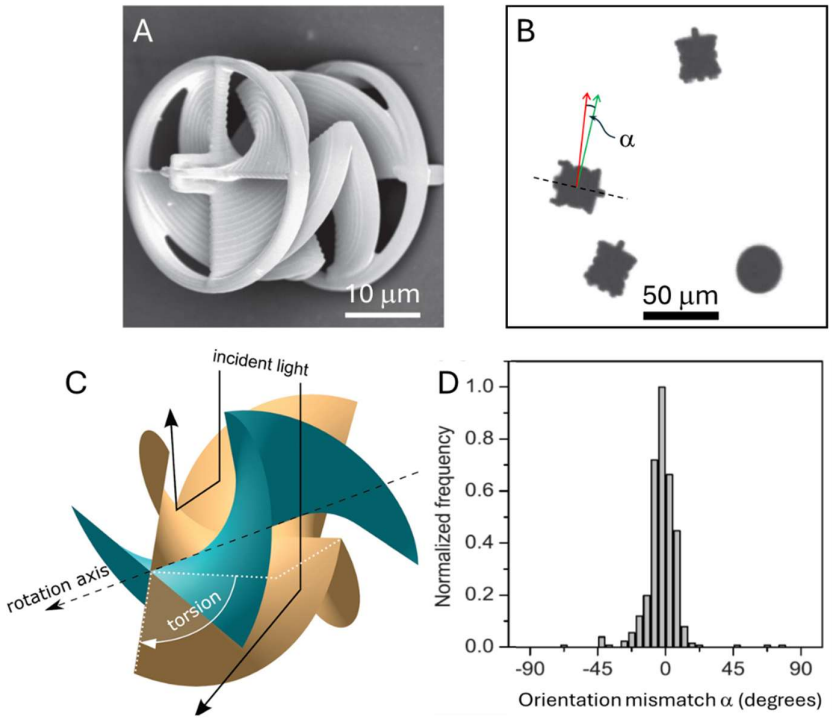


28. ábra. Egy kétdimenziós, prizma típusú rotor modellezése. A: Egy 7 karú, 100%-os reflexióval rendelkező rotor, és az azt megvilágító nyalábok modellje. B: A rotorra ható nyomaték értékei a rotor és a nyalábok relatív irányainak függvényében; az egyes irányokhoz a rotort a képsíkra merőleges tengely körül forgattuk körbe.

A kísérletek során azonban minden esetben azt tapasztaltuk, hogy az ilyen hengerek egy bizonyos helyzetig gördültek, majd megálltak. Ez az eset egy alapvetően 2D probléma, mivel a fény a henger tengelyére merőlegesen érkezik, és a henger felületét, onnan visszaverődve, szintén a tengelyre merőleges irányban hagyja el. Az ezekre a testekre ható nyomatékot sugároptikai modellezéssel elemezve az derült ki, hogy akár reflektív, akár refraktív testekről legyen szó, amíg nem történik fényelnyelés, egy teljes körülfordulás alatt a forgatónyomaték többször előjelet vált, vagyis a nulla értéket is felveszi (28. ábra B). Ezekben a helyzetben pedig a test csapdázódik. Meg kell jegyezni, hogy amint a prizma típusú henger anyagát fényelnyelővé tesszük, a szimuláció talált gördülésre képes elrendezést.

Mivel azonban a kísérletekben használt hengerek aranyozott felületének reflektanciája nagyobb, mint 97%, így abszorpcióval nem számolunk, vagyis a prizma típusú alakot újra kellett gondolni. A megoldást az jelentette, hogy a henger tengelye menti alak-invarianciát megszüntettük, és szó szerint egy csavart vittünk a rendszerbe: a keresztmetszetet alkotó poligon helyzetét az alaptól kiindulva a távolsággal egyenes arányban elforgattuk. A

forgástengely közepénél elcsavarva a rotorokat, a hengerben két, ellentétes helicitású csavart alakítottunk ki (29. ábra C). Ezzel az elrendezéssel azt értük el, hogy a visszavert fény már nem csak a tengelyre merőlegesen hagyja el a testet, hanem lesz azzal párhuzamos komponense is. Lesz ezen kívül olyan nyaláb is, amely a beérkezés irányába verődik vissza, így a teljes impulzusát a testnek adja át. Az ilyen módon elkészített testeknek kulcs paramétere az elcsavarás mértéke volt, amit a szimulációkban 0 és 180 fok között változtattunk. Ez az aszimmetria már elegendő volt ahhoz, hogy a szimuláció találjon olyan elcsavarás tartományt, ahol a nyomaték értéke sosem lesz nulla, vagyis megtörténhet a folyamatos forgás.



29. ábra. A háromdimenziós henger előállítása és alkalmazása. A: Az elkészült henger elektronmikroszkópos képe. B: A hengerek optikai mikroszkópos képei a mintatérben. A forgástengely irányát a szaggatott vonal, az arra merőleges irányt a zöld nyíl, a gördülés irányát a piros nyíl mutatja. C: A torziós alak előállítása egy négy, eredetileg sík lapból álló test közepének megcsavarásával. Folytonos fekete nyilak mutatják a tengely két oldalára azonos irányból beeső nyalábok eltérő módon való visszaverődését. D: A gördülés iránya és a tengelyre merőleges irány eltérésének (α szög) hisztogramja.

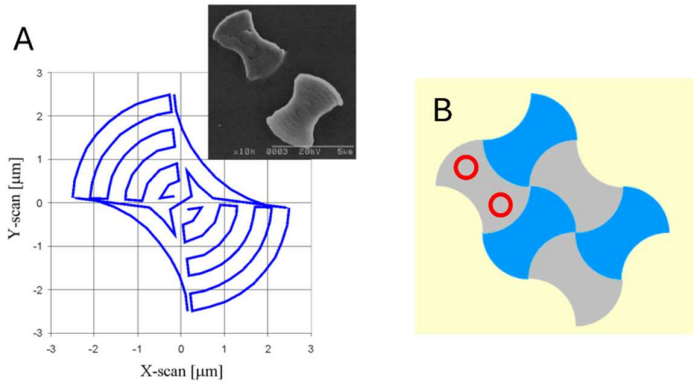
A szimulációk alapján a második kísérletsorozathoz már az elcsavart hengereket terveztem meg, polimerizáltam, és tettem a felületüket reflektálóvá (29. ábra A). Az elcsavarás mértékét a számolás alapján 115 fokra állítottam be. A polimerizáció során a tervezett alaknak a fizikai megvalósítását kellett optimalizálni, figyelembe véve, hogy a polimerizáció során a TPP alapegységének tekinthető voxelek mérete nem elhanyagolható: kb. 0.3 µm széles és 1.5 µm magas ellipszoid. Ez azt jelentette, hogy a henger megcsavart lapjainak minimum 1.5 µm

vastagságuk lesz. A hengerek méretét ezért annyira kellett megnövelni, hogy ez a vastagság jelentősen kisebb legyen, mint a megcsavart felületek közti távolság, hogy a fény elegendő nagy felületről tudjon visszaverődni. A hengerek átmérője és magassága ezért egyaránt kb. 30 μm lett. A reflexióhoz ebben az esetben is 200 nm arany réteget vittem fel a szerkezet felületére. A gördülés elősegítéséhez a henger két végére egy-egy gyűrűt polimerizáltam. A hengereket ezután egy mikroszkóp tárgylemezből készített mintatartóban vízbe merítettünk és a tárgylemez síkjára merőleges irányból megvilágítottuk. Ennek hatására a hengerek, a szimulációkkal összhangban, egyenletes sebességgel gördültek a megvilágított területen (29. ábra B). A mozgásuk iránya csekély szórással minden esetben a hossztengelyükre merőleges irányba történt (29. ábra D). Ezzel a kísérlettel általánosságban is megmutattuk, hogy hengeres testek forgatása tengelyükre merőlegesen beeső homogén intenzitáseloszlású fénnyel csak úgy lehetséges, ha a rendszer nem írható le csupán kétdimenziós problémaként, vagyis, ha a test által visszavert fénynek minden helyzetben van a tengellyel párhuzamos komponense is.

5.2. Optikai csipesz alkalmazása mikroméretű alkatrészek összeszerelésére

Korábban említettem, hogy a kétfotonos polimerizációval készített mikroszerkezetekből összetett mikromechanikai rendszerek hozhatók létre. Ennek alapvetően két módja van: a rendszer elemeit vagy eleve a végleges helyükre polimerizáljuk, vagy azokat, elsősorban mozgó alkatrészeket, a polimerizálás után szereljük össze. Az utóbbihoz sok esetben az elemek mikrométernél pontosabb mozgatása szükséges, amire az optikai csipesz annak precizitása, testre szabhatósága és nem invazív jellege miatt kiválóan alkalmas. Az optikai csipesszel mikrogyöngyöket néhány nanométeres [129], nagyobb szerkezeteket 50-100 nm-es pontossággal lehet megtartani [87, 130]. Ezen kívül a csipeszt az azt létrehozó intenzitás eloszlások és fázismintázatok sokszínűsége is kivételesen alkalmassá teheti mikroeszközök mozgatására [131]. Az irodalomban már a 2000-es évek közepétől találunk példát nanoszálak [132], funkcionalizált mikrogyöngyök [133] vagy akár polimerizált szerkezetek [134] optikai csipesszel való mikro-összeszerelésére („micro assembly”). Annak, hogy a TPP-vel készített, aztán optikai csipesszel összeszerelt mikroeszköz rendszerekre az irodalomban kevés példa található, vélhetően a két technológia kombinálásának komplexitása, és az összeszerelés időigényes volta lehet az oka. Egy nemzetközi kooperáció keretében úttörő módon megmutattuk, hogy lehetséges TPP-vel készített alkatrészek két- és háromdimenziós összeszerelése, akár még automatizált formában is.

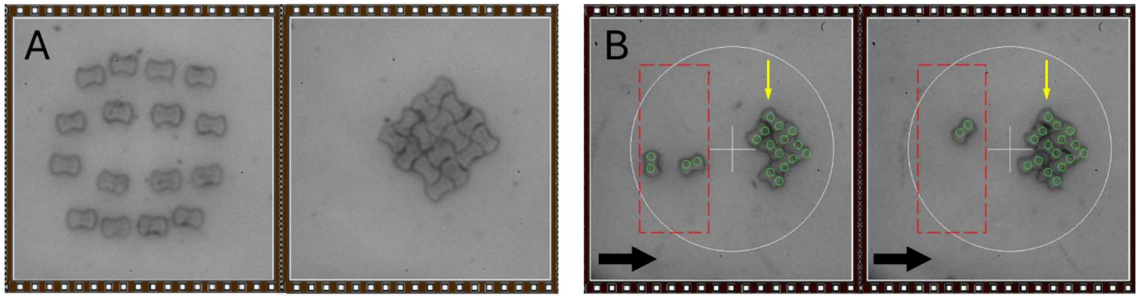
A kétdimenziós összeszerelést [135] olyan sík, nem triviális (pl. szabályos sokszög) alakú mikroméretű elemekkel mutattuk meg, amelyekkel - alkalmas módon elforgatva - egy felületet hézagmentesen be lehet fedni. A 30. ábra A mutatja, hogy erre milyen alakot találtuk megfelelőnek, amelyet aztán Szegeden készítettem el. Ez az alak ezenkívül alkalmas volt arra, hogy egy képfeldolgozó algoritmus segítségével egyértelműen meg lehessen határozni az irányát, a csipesszel pedig alkalmas irányba lehessen forgatni. Az alakokat a két kiszélesedő részüknél lehet az optikai csipesszel megfogni (30. ábra B, piros körök), és 90 fokkal kell elforgatni, hogy egymásba illeszthetők legyenek. A sík elemek összeilleszthetőségéhez a kooperáló partner laborjában egy kétirányú, kis NA-jú megvilágítással működő optikai csipeszt alkalmaztunk, amelyben a csapdázó nyalábok egymással szemben haladnak a mintatérben. A minta két üveglap között néhányszor tíz mikrométer vastag vízréteg volt, amibe a szerkezeteket merítettük.



30. ábra. A kétdimenziós összeszereléshez használt alakzat. A: Az alak terve és elektronmikroszkópos képe (inzert). B: Az elemekkel tervezett felületlefedési mintázat.

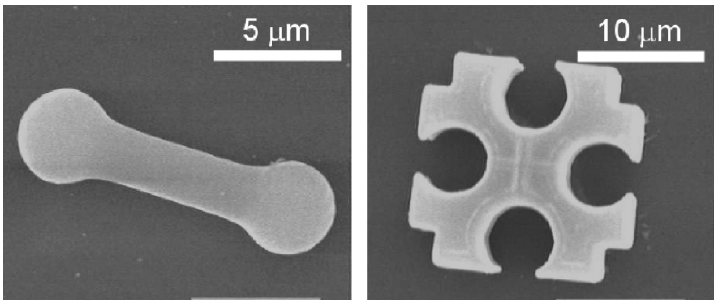
A mintatér aljának az elemek elforgatásával és egymás mellé helyezésével való lefedéséhez három módszert is kipróbáltunk. Az első módszer az alakzatok egyszerű, egymás után történő beillesztése volt egy 4x4-es mintázatba. Ekkor a csipesz kezelője manuálisan, egyenként csapdázza az alakzatokat, forgatja megfelelő irányba és helyezi a megfelelő helyre. Ez a módszer az elemeket viszonylag kisebb sűrűséggel tartalmazó minták esetén hatékony, a legtöbb emberi beavatkozást igényli, és meglehetősen lassú. A második módszert nagyobb elemsűrűség esetén előnyösebb használni, ahol a látótérben lévő elemeket egyszerre ragadja meg az optikai csipesz, és egy előre definiált útvonalon és alakzattá illeszti azokat egyidőben össze (31. ábra A). Ennek során a tárgyasztal nem mozog, a mozgatandó elemek pontos helyzetét és orientációját a csapdázó szoftver határozza meg és az mozgatja a csapdákat az előre meghatározott cél pozíciókba, így összeillesztve az elemeket. A harmadik módszer

teljesen automatikus, és ebben az esetben a tárgyasztal folyamatos egyirányú mozgatásával kerül mindig egy-egy elem a látótérbe. Miután a képtér egy kijelölt területére került az új elem (31. ábra B, pirossal körülkerített terület), a szoftver itt felismeri, meghatározza a helyzetét és csapdázva az előzőleg összeillesztett elemek mellé rendezi (31. ábra B, két-két zöld körrel megjelölt elem).



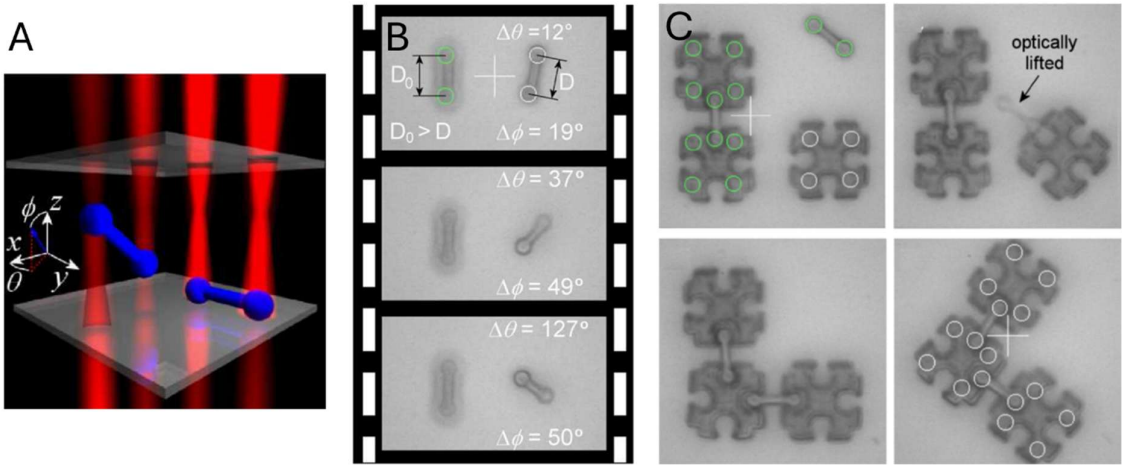
31. ábra. A kétdimenziós összeszerelés két megvalósítási sémája. A: Az összes szerkezetet egyszerre ragadja meg az optikai csipesz, és mozgatja az előre kijelölt helyükre. B: A minta lassú mozgatása során (fekete nyíl) a pirossal keretezett területre érkező szerkezeteket a rendszer felismeri és csapdázza (zöld körök). Ezután a jobb oldalon lévő (sárga nyíl) összeillesztett szerkezetekhez mozgatja.

A háromdimenziós összeszereléshez [136] kétféle szerkezetet terveztem és polimerizáltam. A harmadik dimenzióba történő mozgatást úgy tettük szükségessé, hogy – ellentétben a puzzle darabkák esetével - az egyik fajta szerkezetet nem lehet csak síkban mozgatva belehelyezni a másik alakzat megfelelő részébe, sem onnan kimozdítani, hanem ehhez a mintatér síkjából ki kell emelni a csipesszel. További fontos cél volt, hogy az összeillesztett elemek a csipesz kikapcsolása után is egyben maradjanak. Az alakzatokat úgy terveztem meg, hogy egyrészt egymást kiegészítő alakú, egyszerűen polimerizálható darabkák legyenek, másrészt, hogy ezeket szinte tetszőlegesen hosszú, akár elágazó láncba lehessen összefűzni. A két alak közül az első (32. ábra A) egy 13 μm hosszú „súlyzó” formáját vette fel, amelyet a kiszélesedő végeinél (kb. 4 μm átmérőjű gömb) fogva lehet megfogni a csipesszel, és ezek azok a részek is, melyek a másik alakzatba beleilleszkednek. A második alakzat (32. ábra B) egy kb. 18 μm oldalhosszúságú négyzet alapú hasáb, amelynek négy oldalán a súlyzó gömbjének megfelelő méretű öböl található, ahova azok beilleszthetők. A súlyzó feje egyszerű laterális mozgatással nem nyomható bele a hasáb oldalán lévő öbölbe és nem is húzható ki onnan, csak ha a hasáb magassága (kb. 10 μm) fölé felemeljük a csipesszel.



32. ábra. A 3D összeszereléshez használt súlyzó alakú (balra) és a fogadó öblökkel ellátott (jobbra) szerkezetek.

A kooperáló partnerünk optikai csipesz rendszerével demonstráltuk a 3 dimenziós összeszerelést (33. ábra). Ebben a kísérletben kihasználtuk a kétirányú megvilágítással működő optikai csipesz nagyobb tartományú axiális mozgató képességét, amelyet a szembe haladó nyalábok relatív intenzitásainak változtatásával valósítottunk meg. A csipesszel probléma nélkül sikerült a súlyzókat az optikai tengely mentén mozgatni, tetszőleges irányba forgatni az optikai tengely körül, illetve egy széles szögtartományon (-50° – 50°) bármely laterális tengely körül megdönteni (33. ábra B). Ezzel a súlyzókat döntéssel vagy megemeléssel a hasáb magassága fölé lehetett emelni és az öbölbe helyezni. Az összeszerelés után a szerkezeteket azok termikus fluktuációja nem tudta egymástól eltávolítani, azok hosszú ideig egy egységet alkottak (33. ábra C).



33. ábra. A 3D mikroméretű összeszerelés. A: A súlyzó alakú szerkezet felemelésének sémája kísérletben használt optikai csipesz rendszerben. A piros sávok az egymással szembe haladó csapdázó nyalábokat jelölik. A bal oldali súlyzó felemelése az alsó nyaláb intenzitásának növelésével történik. B: A súlyzó alakú szerkezet elfogatásnak demonstrálása optikai mikroszkópos felvételeken. Az elforgatás szögeit a z és az y tengely körül mértük. C: A 3D összeszerelés menetét bemutató optikai mikroszkópos felvételek. A zöld és a fehér körök a csapdát vezérlő szoftver által a csapdák helyére rajzolt jelek.

A fenti két munkával demonstráltuk, hogy a több mikroméretű alkatrészt tartalmazó rendszerek összeszerelésére az egymásba illeszkedő elemek használata járható út, és hogy ezek pontos mozgatására az optikai csipesz megfelelő eszköz. Megmutattuk, hogy a néhány alkotóelemet magába foglaló egységek már egyben is mozgathatók (transzlálhatók, forgathatók) laterálisan, ami több, egymástól függetlenül összeszerelt részegységnek egy második lépésben történő összeillesztését teszi lehetővé. Ráadásul, egy ilyen mechanikai rendszer az összeszerelést követően az optikai csipesz nélkül is egyben marad egy permanens, komplex mikrokörnyezetet alkotva akár biológiai objektumok számára is.

5.3. Összegzés

1. Üveg hordozóra kialakított, a fény impulzusát szabályozható sebességű, kötött tengelyű forgómozgássá alakító, optikai meghajtással működő mikromotort készítettem kétfotonos polimerizációval. A lapátkerék-szerű mikromotort egy, a vele közös hordozó üvegre polimerizált fényvezető szál végénél készítettem el. A motor meghajtását a fényvezető szálba becsatolt, és a motor előtti végéből kilépő fénynek a lapátkerekekről való visszaverődése miatti impulzusváltozás biztosítja. Megmutattam, hogy a motor a szálba becsatolt intenzitástól függő fordulatszámmal forog. Két független módszerrel meghatároztam a fény által a motornak átadott impulzusnyomatékot, melyek az alkalmazott egyszerűsítéseket figyelembe véve jó egyezést adtak. Kooperációs partnereimmel modellszámítások segítségével javaslatot tettem a motor hatékonyságának növelésére a motor geometriájának megváltoztatásával. Az integrált motor mikromechanikai rendszerek erőforrásaként használható fel. Megmutattam továbbá, hogy a meghajlított mikroméretű fényvezető szálba becsatolt, és azon áthaladó fény annak irányváltozása okozta impulzusváltozás miatt erőt fejt ki a szerkezetre, és mozgásba hozza.

2. Autonóm módon mozgó, fénnyel hajtott objektumok mozgásának a mikrométeres tartományban történő tanulmányozásához készítettem polimer eszközöket. A szerkezetek meghajtását a felületükről visszavert fény impulzusváltozása biztosította. Sík felületen, annak normálisa irányából homogén módon kivilágítva a szerkezetek egyedül alakjuk és helyzetük által meghatározott irányban mozognak. Az autonóm mozgást egy ék alakú, a felületen csúszó, és egy henger alakú, a felületen gördülő testtel demonstráltuk. Mindkét szerkezet esetében kísérletileg igazoltuk, hogy a mozgás - kis szórás mellett – valóban az alakjuk aszimmetriája által meghatározott irányban történik. A hengerek esetében azt is megmutattuk, hogy folyamatos gördülés homogén megvilágítás mellett csak akkor jöhet létre, ha a tengelyre

merőlegesen beeső fénynek annak visszaverődése után van a tengellyel párhuzamos komponense is.

3. Mikromechanikai elemek optikai csipesszel történő két- és háromdimenziós összeszerelését demonstráltam alak-komplementer mikroszerkezetekkel. A kétdimenziós összeszereléshez olyan egyféle alakot késztettem, amit két optikai csipesszel lehet egy síkban forgatni, és amivel egy sík felületet azok helyes irányba történő elforgatásával teljesen le lehet fedni. Az összeszerelést különböző mértékben automatizált eljárásokkal is megmutattam. A háromdimenziós mozgatást igénylő összeszereléshez kétféle, egymásba illeszkedő alakot készítettem. Megmutattam, hogy megfelelő alakú alkatrészekkel optikai csipeszt alkalmazva mikroméretekben is lehetséges olyan összeszerelés, ahol az alkatrészek az összeillesztés után egyben maradnak.

Releváns publikációk

Kelemen, L. et al. APPL. OPT. 45:2777-2780 (2006)
Metzger, NK. J. OPTICS 13:044018 (2011)
Palima, D. et al. OPT. EXPRESS 21:581-593 (2013)
Búzás, A. et al. APP. PHYS. LETT. 101:041111 (2012),
Oroszi, L. et al. APP. PHYS. LETT. 107:204106 (2015)
Rodrigo, PJ. et al. OPT EXPRESS 15:9009-9014 (2007)
Rodrigo, PJ. et al. OPT EXPRESS 17:6578-6583 (2009)

6. Mikroszerkezetek felületkezeléses funkciónövelése

A polimerizált mikroszerkezetek felületének bevonásával azok alkalmazási területe jelentősen kiterjeszthető, mivel a mechanikailag megvalósítható kölcsönhatások mellett az eszközöknek kémiai vagy biológia funkciók adhatók. A bevonások céljai között a mikroeszközök mozgathatósága [115, 137], biológiai makromolekuláknak vagy egész sejteknek a felülethez való rögzítése [138-140] valamint szenzorikai felhasználás [141] is lehet. A bevonás módját a kiindulási felület anyaga és a létrehozandó végső felület határozza meg: ez lehet egyszerű adszorpció, ám leggyakrabban kémiai úton, esetleg valamely összekötő (linker) anyag segítségével kovalens kötéssel rögzítik a funkcionális réteget a felületre. Ez a réteg lehet egy egyszerű fém réteg, állhat nanorészecskékből, de egyszerű szerves molekulák vagy biológiai makromolekulák is alkothatják.

A legtöbb esetben a funkcionalizálás több lépéses folyamat, ahol a legelső molekulának a polimer anyagával kell kölcsönhatnia. A mikroszerkezetek anyagául szolgáló fotopolimerek legnagyobbrészt akril vagy epoxi alapúak. A legtartósabb bevonást mindkét esetben akkor kapjuk, ha a felületen maradt, el nem reagált akril vagy epoxi csoportokkal létrehozott kovalens kötéseken keresztül rögzítjük a kívánt rétegeket a felülethez. A maradék akril csoportok segítségével történő bevonáshoz az irodalomban leggyakrabban azt használják ki, hogy az akril csoportokkal az amino csoportok ($-NH_2$) Michael reakcióval képesek elreagálni. Az etilén diamin két amino csoporttal is rendelkezik, és ezt, mint linkert használva Farrer és munkatársai arany bevonatot hoztak létre 3D polimerizációval, akril alapú fotopolimerből készített tekercs alakú mikroszerkezeteken [74]. Azt illusztrálandó, hogy bármely funkcionalizált felület lehet egy további felület kiindulópontja, Chen és munkatársai továbbmentek az előző példánál, és az akril felületre leválasztott arany rétegre autokatalitikusan („electroless plating”) egy további ezüst réteget vittek fel [142].

Az amino csoportokkal történő reakció az epoxi alapú polimerek esetében is a leghatékonyabb út, ami eredményezhet fém bevonatot [143] vagy szerves molekulák bevonatát is [68, 144]. Fontos, hogy az epoxi alapú polimereknél az amino csoportokkal történő reakciót legtöbbször egy felület-aktiválási lépés, vagyis az epoxi csoportok felszakítása kell megelőzze, ami lehet például kénsavas [69] vagy salétromsavas kezelés [71, 144]. Nagyon izgalmas lehetőségeket rejtenek a több eltérő anyagból készített mikroszerkezetek, mivel ezeknek egyes elemeit akár szelektíven is lehet funkcionalizálni, és így meghatározni, hogy pl. élő sejtek a

szerkezet mely részéhez tapadjanak [145]. A következőkben az epoxi alapú SU-8 polimerből készült mikroszerkezetek funkcionalizálása terén elért eredményeimet mutatom be.

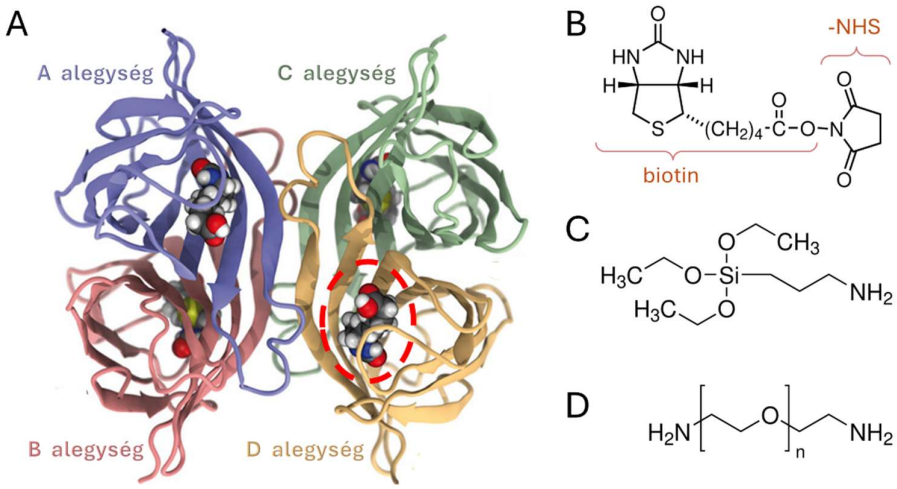
6.1. SU-8 mikroszerkezetek bevonása fehérjével

Biológiai makromolekulák vagy sejtek különböző anyagi minőségű felületekhez történő rögzítésének biokémiai úton az egyik legelterjedtebb módja a sztreptavidin-biotin kapcsolat létrehozása, annak szelektivitása és stabilitása miatt [146, 147]. Az egyes sztreptavidin-biotin kötések erőssége 160 pN körül van [148], ami sok esetben az optikai csipesszel kifejthető erőtartomány feletti érték, vagyis az ilyen módon egymáshoz kötött felületeket – főként, ha több kötés is kialakul – a csipesszel nem lehet szétválasztani. Az eljárás lényege, hogy a kezelendő felülethez, valamint a hozzá kikötendő pl. sejtek felszínéhez, DNS-hez, RNS-hez stb. első lépésben kovalensen hozzá kell kötni a biotin molekulát. Ezek után a négy biotin kötőhellyel rendelkező sztreptavidin fehérjét (34. ábra A, [149]) a mintához adva, az összeköti a biotinnal funkcionalizált objektumokat. Polimerizált 3D mikroszerkezetekre a 2010-es évek elejéig ezt a bevonási módszert azonban nem alkalmazták. A mi célunk azzal, hogy ebben az időszakban szerkezeteinket elkezdtük sztreptavidinnel funkcionalizálni, az volt, hogy elsősorban egyedi sejteket nagy affinitással hozzájuk tudjunk kapcsolni.

A fehérjével való bevonást először egy szilán-alapú, amino csoportot is tartalmazó linker molekula segítségével dolgoztuk ki, amely lehetővé tette a biotinnak az SU-8 felületi epoxi csoportjaihoz való kötését [150]. Az irodalomból ismert volt, hogy aminoszilánok segítségével (pl. APTES vagy APTMS) az SU-8 fotopolimer [69] de akár üveg felületén is [151] ki lehet alakítani egy amino csoportok alkotta réteget. Mind az amino csoportok SU-8 felülethez kötése, mind a biotinnak az amino csoportokhoz kötése kovalens módon történik. Mi az aminopropil trietoxi-szilánt (APTES) választottuk (34. ábra C), amelyben a központi szilícium atomhoz három etoxi csoport és – közvetve – egy amino csoport kapcsolódik.

Az SU-8 APTES-alapú fehérje bevonására a következő módszert dolgoztuk ki és optimalizáltuk. A polimerizált mikroszerkezetek felszíni, polimerizálás utáni maradék epoxi csoportjainak felszakítására, és így felületi hidroxil csoportok létrehozására egy 1 M salétromsavat és 0.1 ammónium-cérium(IV)-nitrátot (CAN) tartalmazó vizes oldatot használtunk [71], változtatva az inkubáció idejét 0.5 és 4 óra között. A hidroxil csoportokhoz tud az APTES az etoxi csoportjain keresztül kovalensen hozzákötni. Az amino réteg kialakításához a savval kezelt mintát 90 percig izopropanolban oldott APTES-ben (2 v/v%)

áztattuk. A következő, izopropanolos mosás utáni lépésben egy szulfo-NHS biotin nevű molekulának a vizes oldatában (1 mg/mL) inkubáltuk a mintát 4 órán át. Ebben a molekulában (34. ábra B) a biotin karboxil csoportjához egy –NHS (N-hidroxiszukcinimid) csoport van kötve, amely amino csoport jelenlétében azonban leválik, lehetővé téve, hogy a biotin az amino csoporthoz kössön. A biotinált mintát ezek után inkubáltuk PBS-ben oldott sztreptavidin fehérjével (10 nM vagy 100 nM, pH=7.4).

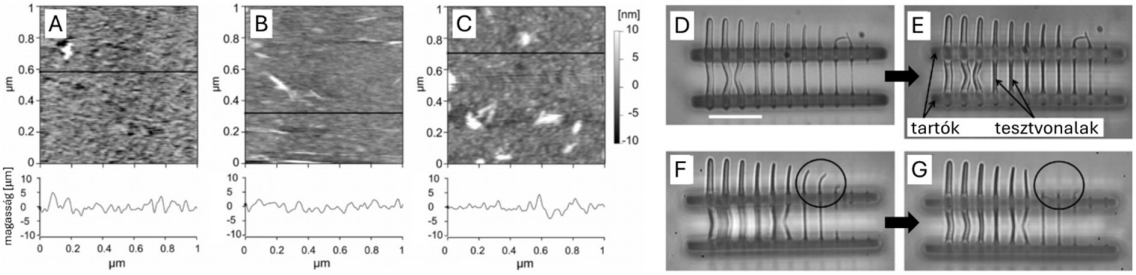


34. ábra. Az SU-8 mikroszerkezetek sztreptavidinnel való bevonásához szükséges molekulák. A: a négy alegységes sztreptavidin fehérje vázlatos képe az egyes kötőhelyekre bekötött biotin molekulákkal (gömb reprezentációval ábrázolva). A D alegységbe bekötött biotint pirossal bekereteztem. B: NHS biotin molekula. C: aminopropil dietoxi-szilán. D: PEG-diamin

Ahhoz, hogy meggyőződjünk, hogy mindegyik lépés szükséges a sztreptavidinnek a felülethez való kötődéséhez, a mintákat a biotinálásig történő egyes lépések után 12 órán keresztül inkubáltuk a sztreptavidin fluoreszcensen megjelölt változatával. Az így felülethez kötött fehérje mennyiségét kvantitatív fluoreszcens mikroszkópiával állapítottuk meg [152].

A felületkezelés lépéseinek hatásai a következőkben foglalhatók össze. A kezdeti savas kezelés hatását több módszerrel is vizsgáltuk. Optikai mikroszkóppal azt láttuk, hogy a 2 órás kezelés a polimerizált szerkezetek legvékonyabb, kb. 0.5 µm vastag részeit eltávolította, vagyis jelentősen roncsolta a mintát (35. ábra F, G). Vizes kontaktszög mérést végezve a savval kezelt sík SU-8 felületen kiderült, hogy a kezdetben erősen hidrofób felület inkább hidrofil jelleget mutatott a savas kezelés hatására: a kontaktszög 2 órás kezeléssel 82 fokról 42 fokra csökkent. Ezen kívül a felületi hidroxil csoportok mennyiségét is meghatároztuk egy színreakcióval, és azt tapasztaltuk, hogy azok száma a 2 órás kezelés során több, mint 5-szörösére növekedett. A felületet atomerő mikroszkópiával vizsgálva azt találtuk, hogy némileg kisimult: a kezeletlen

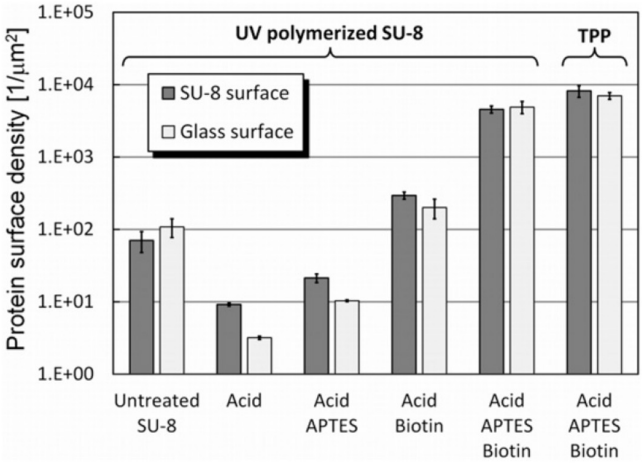
SU-8 érdessége 2.6 nm, a 30 percig savval kezelté pedig 1.8 nm volt (35. ábra A, B ábra). Érdekes módon, amikor a különböző ideig savval kezelt mintákat inkubáltuk APTES-sel majd NHS biotinnal, azt tapasztaltuk, hogy a több felületi hidroxil csoportot eredményező, hosszú idejű savas kezelés esetében kevesebb fehérje tapad ki a felületre. Mindezeket összevetve, a savas kezelés optimális idejét 30 percben állapítottuk meg, és azóta is ezt használjuk.



35. ábra. Az SU-8 felületkezelés hatásai. A-C: SU-8 felület érdessége atomerő mikroszkópiával mérve nem kezelt (A), savval kezelt (B) és fehérjével borított (C) felületeken. D-G: a savas kezelés hatása vékony SU-8 vonalak morfológiájára. Nem kezelt tesztvonalak: D és F; ugyanazon vonalak 30 perces (E) és 120 perces (G) savas kezelés után. Az eltűnő vonalak feketével vannak bekeretezve. A méretskála 10 µm.

A savas kezelést követő szilános és a biotinos inkubációs lépések során az alkalmazott magas koncentrációval és hosszú inkubációs idővel az előzőleg létrehozott hidroxil csoportokat telítettük, és így biztosítottuk, hogy az utolsó lépésben, a fehérjével való kezelés során a lehető legmagasabb felületi fehérje koncentrációt érjük el. A kvantitatív fehérje fluoreszcencia mérésekből (36. ábra) az derült ki, hogy a legnagyobb felületi fehérje borítottsághoz a folyamat összes lépése szükséges: legmagasabb, 5-8*10^3 fehérje/µm^2 értékhez a CAN, az APTES és a biotin kezelés egyaránt kellett. Ez az érték egyébként független attól, hogy legvégül 10 nM-os vagy 100 nM-os fehérje oldatban inkubáltuk-e a mintát. Az APTES kezelés elhagyása ennek kb. tizedére csökkentette a felületen mért fehérje mennyiséget, a biotin elhagyása pedig kevesebb, mint századára. A csak savas kezelést kapott SU-8 felületre pedig több mint 3 nagyságrenddel kevesebb fehérje képes kikötni. A kapott eredmények hibahatáron belül megegyeztek az UV-megvilágítással és a kétfotonos polimerizációval létrehozott SU-8 felületeken. Az 5-8*10^3 fehérje/µm^2 érték egyébként úgy is értelmezhető, mintha a polimer felületének kb. 20-35 %-a volna egy fehérje monoréteggel bevonva. Bár ezzel a módszerrel stabil, 3 nap múlva is jelen lévő fehérje réteget voltunk képesek létrehozni a felületen, hátránya

az volt, hogy egyáltalán nem szelektív az SU-8-ra, vagyis a mikroeszközöket tartó üveglapon is ugyanakkora felületi fehérje koncentráció alakult ki.

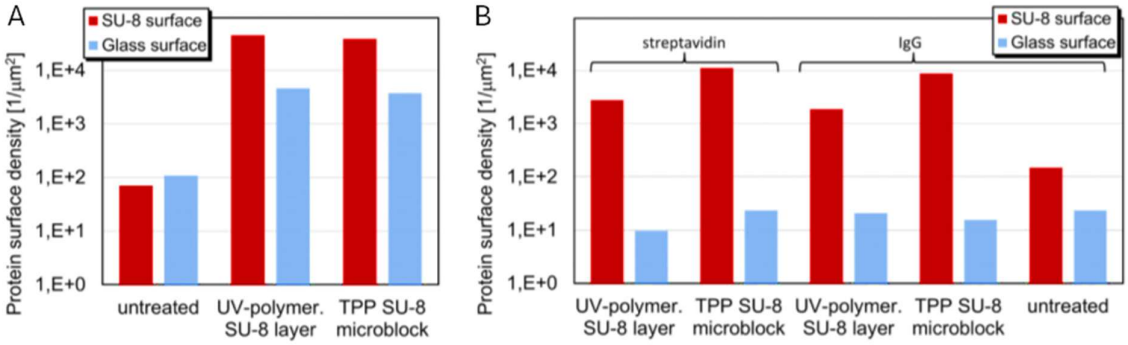


36. ábra. Sztreptavidin fehérje koncentrációja SU-8 felületén az egyes kezelési lépéseket követően, APTES összekötő molekulát alkalmazva.

A felületi fehérje koncentráció jelentős növelését és a fotopolimer szelektív bevonását sikerült megvalósítanunk egy másik összekötő molekula alkalmazásával [153]. Polietilén-glikol-diaminnal (PEG-diamin, 34. ábra D), mint felületi aminocsoport réteget létrehozni képes molekulával találkozhatunk az irodalomban [154]. Mivel a PEG lánc végein lévő amino csoportok az SU-8 felület epoxi csoportjaival képesek reagálni, így ez az összekötő molekula kovalensen a köthető felülethez. Szerepe azonos az előzőekben bemutatott APTES-sel: a szabad amino csoportjaihoz NHS biotin kapcsolható. Kísérleteinkben az SU-8 réteg kezdeti savas kezelését egy metanolban feloldott (15 mM) 2 kDa molekulasúlyú PEG diamin kezelés követte, amit pedig a szintén korábban bemutatott szulfo-NHS biotinos inkubáció. A kvantitatív fluoreszcencia mérések (37. ábra A) megmutatták, hogy a polimer felületén a fehérje koncentrációt az APTES linkerhez képest a PEG diaminnal közel egy nagyságrenddel sikerült növelni ($4*10^4$ STA/μm^2). Ez azt jelenti, hogy a szerkezeteket a sztreptavidin kb. 2 összefüggő rétegben fedi be. Mindeközben azonban az üveg felületre több, mint tízszer kevesebb fehérje került, vagyis ez a módszer jóval szelektívebb az SU-8-ra.

Ezzel párhuzamosan egy olyan fehérje kikötési eljárást is teszteltünk az SU-8 felületen, ami nem specifikus a sztreptavidinre. Ennek során a savas és PEG diaminos kezelést a biotin helyett egy glutáraldehides kezelés követte (2.5% PBS oldatban). A glutáraldehid, amit sejtek, szövetek fixálására is használnak, képes aminocsoportokkal reagálni, ezért alkalmas a PEG diamin végén lévő ilyen csoportokhoz fehérjéket kikötni azok felszíni aminocsoportjain

keresztül. Ebben a nem specifikus esetben (37. ábra B) a felületi fehérje koncentráció kb. az APTES-es esettel volt összemérhető (3-10*10^3 fehérje/μm^2) kétféle fluoreszcensen jelölt fehérjét is alkalmazva (sztreptavidin és immunoglobulin G). Ez az érték az üveg hordozón majdnem három nagyságrenddel kisebb volt, mint az SU-8-on, vagyis ez a módszer jóval hatékonyabb a polimerre vonatkozóan.



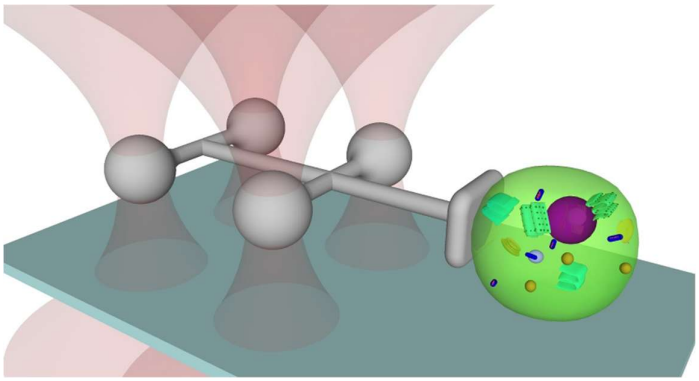
37. ábra. Sztreptavidin fehérje koncentrációja SU-8 felületén az egyes kezelési lépéseket követően, PEG-diamin (A), és glutáraldehid (B) összekötő molekulát alkalmazva.

Sikerült tehát az irodalomból olyan módszereket az SU-8 mikroszerkezetek bevonására adaptálni, amivel azokat fehérje-specifikusan, nagy felületi koncentrációban és szelektíven funkcionalizálhatjuk. Ezek a bevonási módszerek megnyitották az utat ahhoz, hogy a polimer mikroszerkezetekhez egyedi sejteket tudjunk kapcsolni melyeket aztán tetszőlegesen tudunk mozgatni az optikai csipesz segítségével.

6.2. Egyedi sejt optikai manipulációja funkcionalizált mikroszerkezetekkel

Egyedi sejteket optikai csipesszel már az eszköz felfedezése után nem sokkal csapdáztak [155]. Számos tanulmány foglalkozik azzal, hogy a csapdázó nyaláb fókuszában direkt módon csapdába ejtett élő sejt mennyire tolerálja az intenzív megvilágítást [156-158]. Direkt sejtcsapdázásnak azt az esetet nevezem, amikor a csapdázó nyaláb magát a sejtet világítja meg. Ennek a módszernek a sejtek esetleges foto vagy termikus eredetű károsítása mellett más hátránya is van: a sejt és a környező vizes oldat közötti, a csapdaerőt meghatározó törésmutató különbség igen csekély ($\Delta n \sim 0.1$, [159]), valamint a sejtek optikailag inhomogén belső szerkezete miatt a csapda pontos pozíciója nem jól definiált. Ezeknek a hátrányoknak a kiküszöbölése miatt használnak sejtekhez rögzített polimer vagy kvarc mikrogolyókat (~1 μm átmérővel) és ezeket csapdázzák, amivel jól definiált módon, akár több száz pikonewton erőt is ki lehet fejteni [160].

A sejtek polimer mikroszerkezetekkel történő indirekt csapdázása az egyszerű golyókkal összehasonlítva két fő előnnyel jár: a csapdázó fókuszt még távolabb lehet pozícionálni a sejttől, ami tovább csökkenti a károsítás esélyét, valamint jóval komplexebb mozgatási módok is elérhetők. Az indirekt csapdázást az teszi lehetővé, hogy a mikroszerkezeteket megfelelő anyaggal bevonva a sejteket hozzájuk lehet tapasztani. Ezt célozta a szerkezetek PEG diamin segítségével történő sztreptavidines bevonása. Ahhoz azonban, hogy a sejtek ilyen a felülethez tapadjanak membránjukat biotinnal kell kezelni. Ez szerencsére egy standard módszer a szerkezetek biotinálásánál is használt szulfo-NHS biotinnal, ami a gyártói protokollt betartva a sejtek életképességét nem befolyásolja. Hátrányként jelentkezik, hogy a sejteket a csapdázás után nem tudjuk elválasztani a szerkezettől.

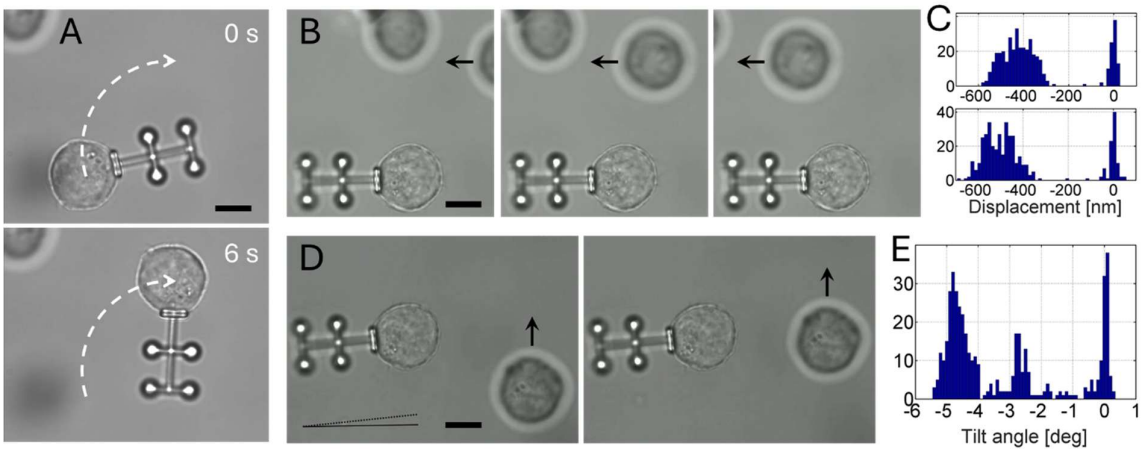


38. ábra. Sejtmanipulátor szerkezet (szürke), a hozzá csatolt sejt (zöld gömb) és a szerkezetet csapdázó 4 fókuszált nyalábbal (rózsaszín) vázlatos képe.

A sejteknek a polimer mikroeszközökkel, 3D-ban való mozgatásához a holografikus optikai csipesz rendszerünket (HOT) használtuk. A polimer mikroeszközeink (melyekre egy példát a 38. ábra mutat) minden esetben három alapegységből állnak: *i)* kb. 4 μm átmérőjű gömbökből, amelyeket a csapdázó fókusz megvilágít, így a csipesz ezeknél fogva ragadja meg a szerkezetet, *ii)* a sejtekhez tapadó, pár tíz μm^2 felületű sík vagy homorú lapból, illetve *iii)* az ezeket összekötő strukturális elemekből, amelyek többnyire egyszerű, 1-2 μm átmérőjű rudak.

Az indirekt optikai manipulációt demonstráló munkában K562 sejteket használtunk, amelyek egy humán limfoblaszt sejtvonalhoz tartoznak, és jellemzően gömb alakú, nem letapadó sejtek. A sejtek membránját biotináltuk (1 mg/mL szulfo-NHS biotin PBS pufferben, 30 perc inkubálással), majd a mintatartóban hozzájuk adtuk a sztreptavidinnel borított polimer szerkezeteket. A sejtekhez való tapadás gyakoriságának meghatározásához egyszerű ellipszoidokat használtunk, amelyeket csapdázva az üveg hordozóra kitapadt sejtekhez

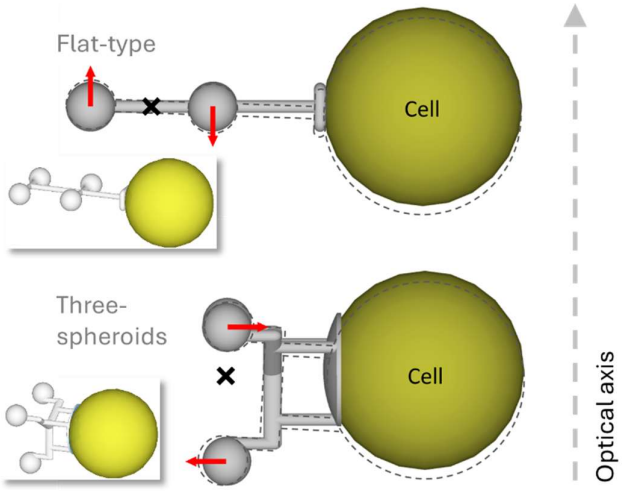
nyomtunk. A tapadás a szerkezetek közel 90%-a esetében 1-5 másodperc alatt létrejött, miután optikai erőkkel már nem lehetett az ellipsziseket elválasztani a sejtektől. Érdekes, hogy nem biotinált sejtekhez a funkcionalizált ellipszoidok kb. 30%-a hozzátapadt. A nem kezelt szerkezetek 7.5% és 2.5% valószínűséggel tapadtak a kezelt és a nem kezelt sejtekhez. Az ellipszoidokat nem letapadt sejtekhez tapasztva kb. tíz μm/s nagyságrendű sebességgel tudtuk mozgatni a mintatérben a mintamozgató asztal mozgatásával. A megfigyelt sebességből a sejt mérete ismeretében kiszámoltuk a sejtre ható viszkózus erőt, aminek a legnagyobb értéke 30 pN volt. Az ennél nagyobb közegellenállási erőt eredményező sebességek estén az ellipszoid kiesett a csapdából, de a sejttől sosem vált el. Ez triviálisan azt is jelenti, hogy a kettőjük közti tapadási erő legalább 30 pN.



39. ábra. Sejtmanipulátorhoz rögzített sejt forgatása és transzlációja. A: Egy K562 sejtnek egy négyfókuszú optikai csipesszel megfogott szerkezettel való forgatása az optikai tengellyel párhuzamos tengely körül. B, D: A sejt csapdázott szerkezettel való transzlálása a tárgyasztalnak a fekete nyíl irányába történő mozgatásával. C: A sejtmanipulátor elmozdulása az egyensúlyi helyzetből a szerkezet hossztengelyével párhuzamos mozgatása közben. Felső kép: előre mozgatás, alsó kép: hátrafelé mozgatás. E: a sejtmanipulátor elfordulása az eredeti helyzetéből a D ábrán látható mozgatás közben. A sejtet minden esetben 10 μm-rel az üveg hordozó felett tartottuk. A fókuszon kívüli, az üveg hordozón lévő sejtek referenciaként szolgálnak. A méretskála 10 μm.

A sejtek mozgatásához használt komplex szerkezeteket négy csapdázó fókusz használatával terveztük, így négy, egy síkban lévő gömbbel láttuk el. A sejtek egy ugyanebben a síkban lévő 3 μm x 4 μm oldalhosszúságú téglalaphoz tapadtak. Kísérleteinkkel demonstráltuk, hogy a mikroeszközhöz tapasztott sejtet mindhárom dimenzió mentén lehet transzlálni akár a csipeszpozíciók akár az optikai asztal mozgatása által, az optikai csipesszel pedig három tengely körül bizonyos tartományban forgatni (optikai tengely menti forgatás: 39. ábra A). A publikációnk megjelenésekor ez volt az első olyan komplex mikroeszköz, amellyel egy hozzá tapasztott egyedi élő sejtet optikai csipesszel mozgattak. A sejteknek a szerkezet

hossztengelyével párhuzamos irányba történő laterális transzlációja esetében (39. ábra B) a maximális sebesség, amikor még nem esett ki a szerkezet a csapdából 19 μm/s volt, aminél az eszköz kb. fél mikrométert mozdult ki az egyensúlyi helyzetéből (39. ábra C). Az erre merőleges mozgás esetén (39. ábra D) a viszkózus ellenállás forgatónyomatékot fejtett ki a szerkezetre, aminek hatására az kb. 5 fokkal el is fordult (39. ábra E).



40. ábra. Sejtmanipulátor szerkezetek sematikus ábrái optikai tengelyre merőleges (felső) és azzal párhuzamos (alsó) síkot alkotó csapdázó gömbökkel. A kisméretű képek ugyanazon elrendezések perspektivikus nézetei. Piros nyilak: a csapdázó gömbök egyensúlyi helyzetből való elmozdulásának irányai a sejt súlyának hatására. A szaggatott vonalas sziluett az egyensúlyi helyzetből kimozdult sejt-szerkezet párost mutatja.

A sejtek teljesen szabad 6 szabadsági fokú mozgatásához egy merőben másfajta szerkezetet terveztünk, amely jóval stabilabb mozgatást tett lehetővé [130, 161]. Azzal a szerkezettel ugyanis, melynek a négy gömbje és a sejtfogó lapkája egy síkban van, bizonyos forgatások csak limitált tartományban működtek, illetve a sejtet felemelve az üveg hordozóról a sejt-szerkezet páros annyira megbillen, hogy kiesik a csapdából. Ez utóbbinak az az oka, hogy a vízénél nagyobb sűrűségű sejt súlya forgatónyomatékot fejt ki az eszközre, ahol az erőkar hossza hozzávetőlegesen a sejt tömegközéppontja és az optikai csipesz nyomaték középpontja (40. ábra, fekete **X**) közötti távolság. A nyomaték középpontot az N darab csapdázó fókusz „tömegközéppontjaként” lehet felfogni, ahol a „tömegek” az egyes fókuszok intenzitásai. A síkból történő kibillenés megmagyarázható, ha figyelembe vesszük, hogy ennek során a csapdázó gömbök az optikai tengely irányába mozdulnak el (40. ábra, piros nyilak). Az az ebbe az irányba való elmozduláshoz tartozó csapdaállandó azonban kicsi, jóval kisebb, mint az erre merőleges irányokhoz tartozó, ezért a visszatérítő erő is kicsi. Ezért olyan szerkezetet terveztünk, ahol a csapdázó gömbök alkotta sík az optikai tengellyel párhuzamos, és könnyen

belátható, hogy ebben az esetben a sejt lefelé mozdulása a gömbök laterális elmozdulását eredményezi. Mivel ebben az irányban nagyobb a csapdaállandó, tehát a visszatérítő erő is, a hasonló méretű erőkar mellett ez az erő már ellensúlyozza a sejtek súlyából fakadó nyomatékot. A 40. ábra alsó szerkezetén a sejthez tapadó lapka a három csapdázó gömb alkotta háromszög síkján kívül, annak közepe fölött van. Az így elért stabilitással már megvalósítható volt a sejtek hat szabadsági fokú mozgatása a hozzájuk kötött sejtek nagyon kismértékű fluktuációjával. Ennek az eszköznek a képességeit és alkalmazását a sejtek mikroszkópos leképezésében a 8.2 fejezetben mutatom be részletesen.

További fejlesztés volt az indirekt sejtmanipuláció módszerében, hogy kidolgoztunk egy olyan módszert, amivel a sejtek kezelés nélkül is hozzátapaszthatók a szerkezetekhez. Itt azt használtuk ki, hogy az emlős K562 sejtek felszínét egy cukrokban gazdag réteg (glikokalix) fedi, amihez bizonyos fehérjék (pl. a konkavalin A, vagy ConA) nagy affinitással kötődnek. A ConA-val történő bevonáshoz az SU-8 szerkezeteket először a korábbi eljárásunkkal sztreptavidinnel borítottuk be, majd egy további lépésben biotinált ConA-val kezeltük, vagyis a biotin kötötte a ConA-t a sztreptavidines felülethez. Az ezzel a bevonattal kezelt szerkezetek néhány másodperc alatt a sejtekhez tapadtak, melyeket ezután tetszőlegesen lehetett mozgatni az optikai csipesszel. A ConA-s sejttapasztással végrehajtott sejtmanipulációs kísérletről a 8.2.2 fejezetben fogok részletesen írni.

6.3. WGM detektor készítése fehérje jelölésmentes érzékeléséhez

Az epoxi alapó SU-8 fotopolimer felületének funkcionalizálása az ebből az anyagból készült mikroszerkezetek szenzorikai alkalmazását is lehetővé teszi. Egy ilyen alkalmazásra, nevezetesen fehérjének vizes oldatból, specifikusan, jelölésmentesen és csak optikai alapon történő kimutatására kidolgoztunk egy proof-of-concept megoldást [162]. A munka olasz kooperáló partnerrel közösen készült, amiben a partnerünk feladata a mikrofluidikai környezet elkészítése volt, a mi feladatunk pedig ebben a rendszerben polimerizálni a detektort és annak felületét funkcionalizálni. A közös munka legfontosabb aspektusa az volt, hogy mind a mikrofluidikai rendszer, mind a detektor ultragyors lézeres anyagmegmunkáláson alapult: az elsőt szubtraktív, tehát anyageltávolításos technikával, a másodikat a TPP additív technikájával hoztuk létre. A monolit mikrofluidikai csatorna (41. ábra A) egyetlen kvarc blokkból készült el, röviden összefoglalva a következőképpen: a kvarcot megfelelő pásztázási útvonalon a lézerrel megvilágítják, minek hatására a megvilágított terület oldhatósága hidrogén fluorid

(HF) számára jelentősen megnő. Ezután 20%-os HF oldatba merítve, a blokkból kioldódik a kvarc a megvilágított területen, megfelelő alakú csatornákat alakítva ki benne. Ezután következett a polimerizációs lépés. Ennek során a kialakított csatornákat megtöltöttük SU-8-cal, majd a csatornarendszer megfelelő helyén kivilágítva azt megpolimerizáltuk a 3D detektor szerkezetet. Végül az SU-8 előhívó oldatában áztatva a mintát, kioldottuk a meg nem polimerizált fotopolimert.

A következőkben bemutatom a teljes rendszert, ahol kiemelem a detektálás optikai elvét, a rendszer tervezésének, a fent összefoglalt marásnak és polimerizálás-előhívásnak a kritikus lépéseit. A detektálás a rendszerünkben az ún. „suttogó galéria módusokon" (Whispering Gallery Mode, WGM) alapszik. A WGM detektor központi eleme a rezonátor, amibe bizonyos hullámhosszúságú fényt evaneszcens módon be lehet csatolni. Az egyik legelterjedtebb becsatolási mód az, amikor egy fényvezető szálat helyeznek a rezonátor mellé, és a szálban terjedő fény lép át a rezonátorba. A rezonátorban terjedő fény módusszerkezetét a rezonátor geometriája és törésmutatója, valamint a fény hullámhossza és polarizációja szabja meg, és többnyire igen összetett [163]. Munkánknak távolról sem volt célja a WGM detektorunk módusszerkezetét tanulmányozni, hanem az eszközünk fehérjedetektálásban való alkalmazhatóságát próbáltuk optimalizálni. A terjedni képes módusokat az egész értékű móduszámokkal szokás jellemezni, amik lehetnek radiálisak (q), azimutálisak (l), polárisak (m) vagy angulárisak (r).

A becsatolás az egyes módusokba korong alakú rezonátor esetén azokon a frekvenciákon lehetséges, amire igaz a következő, már egyszerűsítéseket is tartalmazó egyenlet:

$$\nu_{lqp} = \frac{c}{2\pi nR}\left[l + a_q\left(\frac{l}{2}\right)^{\frac{1}{3}} + p\left(\sqrt{\frac{R}{\rho}} - 1\right) - \frac{\chi n}{\sqrt{n^2-1}} + \frac{1}{2}\sqrt{\frac{R}{\rho}} + \frac{3a_q^2}{20}\left(\frac{l}{2}\right)^{-\frac{1}{3}}\right] \quad (11)$$

ahol c a fénysebesség, R a rezonátorkorong sugara, n a törésmutatója, a_q az Airy függvény q-dik zérushelye, ρ a rezonátorkorong palástjának görbületi sugara, a χ értéke polarizációfüggő módon 1 vagy $1/n^2$, az α_q pedig az Airy függvény q-dik gyöke és a $[3\pi/2(q-1/4)]2/3$ értékkel közelíthető. A becsatolható módusok frekvenciája nagy l (~1000) értékekre és egyszerű móduskép esetén (p=0, q=1) a

$$\nu_{l10} = \frac{cl}{2\pi nR} \quad (12)$$

alakkal közelíthető, ami a rezonátor kerülete és a hullámhossz között teremt egyszerű arányossági kapcsolatot.

A WGM rezonátorral történő érzékelés azon alapszik, hogy a kerület mentén terjedő módusok evaneszcens módon részben kilépnek az anyagból és így „érzékelik" az azon kívüli körülményeket. Ha megváltozik vagy a rezonátor sugara, vagy a fény által érzékelt n_{eff} effektív törésmutató, a becsatolható hullámhossz a

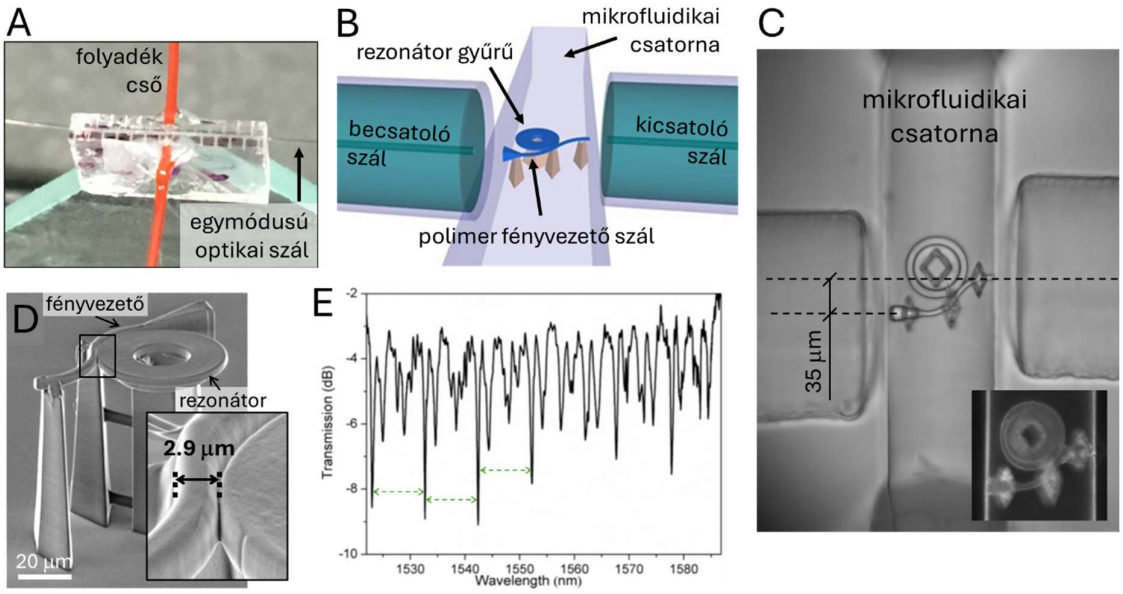
$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = \frac{\Delta n_{eff}}{n_{eff}} + \frac{\Delta R}{R} \tag{13}$$

összefüggés szerint eltolódik. A detektálásra biológiai érzékelés esetén a törésmutató változás alkalmas: ha pl. a detektálni kívánt fehérje akár egy molekuláris réteg vastagságban rárakódik a felületre, az megváltoztatja az evaneszcens fény útjában a törésmutatót, és ezért megváltozik a becsatolás feltétele. A WGM rezonátorok minőségi jellemzője a Q faktor, ami a becsatolt sávok λ hullámhosszának és azok δλ szélességének Q = λ/δλ aránya: minél nagyobb ez a szám, annál érzékenyebb a rendszer.

A mi eszközünkben (41. ábra D) a rezonátor egy kb. 2 μm vastag SU-8 fotopolimer korong volt, az ebbe való becsatolást pedig közvetlenül a mellé polimerizált fényvezető szál biztosította: a szálba belevezetett széles spektrumú fényből csatolódtak át a megfelelő hullámhosszak a rezonátorba. A mikrofluidikai rendszert úgy alakítottuk ki, hogy a polimer fényvezető szál végeinél egy-egy csatornát készítettünk, melyekbe egy-egy makroszkopikus egymódusú fényvezetőt lehetett behelyezni, amelyek közül az egyik a polimer fényvezetőbe juttatta a széles spektrumú mérőfényt. A polimer fényvezető másik végén kilépő mérőfényt a másik egymódusú szál összegyűjtötte, és egy spektrométerhez vezette. A rezonátor, és a mellé polimerizált fényvezető szál a folyadékáramban foglalt helyet, és amikor a mérendő fehérje kitapadt a rezonátor felületén, a becsatolás feltételei megváltoztak, jól mérhetően megváltoztatva a mérőfény spektrumát. A mérőfény hullámhosszául az 1520-1590 nm közötti tartományt választottuk.

A fehérje szenzorunk szerkezetének felépítése és optimalizálása a következő elvek szerint történt. A rezonátort és a mellé polimerizált fényvezetőt (41. ábra B-D) a folyadékcsatornát kétoldalról megvilágító fényvezető szálak középvonalában, vagyis a csatorna aljától kb. 70 μm-re helyeztük el. Ehhez rombusz keresztmetszetű, felfelé keskenyedő lábazatot készítettünk, ami a folyadékáramlás irányába csak kicsiny felületet mutat. Ahhoz, hogy az első makroszkopikus fényvezető szál ne pontosan a második, kicsatoló szál felé világítson, vagyis a második szálba ne jusson direkt módon az első szálból kilépő fény, ezek csatornáinak tengelyét 35 μm-rel eltoltuk egymáshoz képest. Emiatt a polimerizált fényvezető

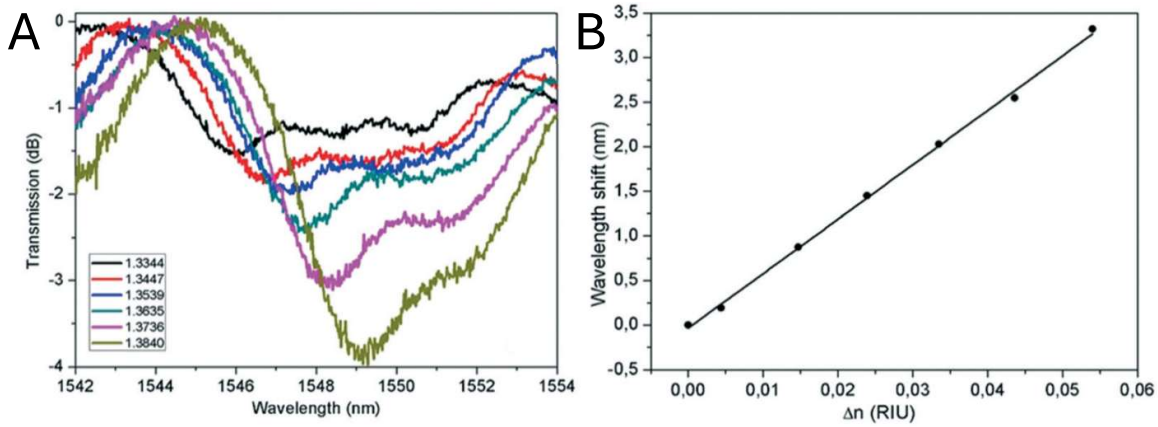
szálat íves alakúra kellett tervezni, melynek hosszát a csatorna szélességét kitöltendő, 90 µm-re választottuk.



41. ábra. Polimerizált WGM detektor mikrofluidikai csatornában. A: Az összeszerelt detektor egység a beragasztott egymódusú fényvezetőkkel és a folyadékot szállító műanyag csövekkel (piros). B: A detektor sematikus elrendezése a mikrofluidikai csatornában. C: Mikrofluidikai csatornába polimerizált detektor fénymikroszkópos képe. A kis képen ugyanezen detektor fluoreszcens fehérjével megkezelt változata fluoreszcens mikroszkóppal nézve. D: A polimerizált detektor elektronmikroszkópos képe. A kis képen a fényvezető szál és a WGM rezonátor érintkezése látható. E: A WGM detektor transzmittancia spektruma levegőben. A zöld nyilak egy adott módus egymást követő *l* értékei közötti ~10 nm-es távolságokat jelölik (FSR).

A polimerizált fényvezető vastagsága akkora kellett legyen, hogy az a mérőfény hullámhosszán egymódusú szálként működjön, ezért az átmérőjét 3 µm-re választottuk. A rezonátor egy 50 µm átmérőjű és kb. 2 µm vastag korong volt. Ennek optimalizálása során az átmérőt a 25 µm és a 65 µm között változtattuk. Bár megfigyeltük, hogy a Q faktor nagyobb átmérőnél magasabb értéket ér el, azonban a mikrofluidikai csatorna mérete egy praktikus határt állított fel mind a polimerizált fényvezető szál hosszára, mind a rezonátor átmérőjére. A rezonátor R sugarából és n törésmutatójából a $\Delta\lambda = \lambda^2(2\pi Rn)^{-1}$ összefüggéssel kiszámolható az egyes módusok távolsága a λ mérési hullámhossz körül a transzmissziós spektrumban. A szerkezetünk 25 µm-es sugarát és az SU-8 fotopolimer 1.59-es törésmutatóját behelyettesítve a módusok távolságára 1540 nm körül 9.5 nm-t kapunk, ami a levegőben mért spektrummal igen jó egyezést mutat (41. ábra E, zöld nyilak).

Az utolsó optimalizálandó paraméter a polimerizált szál és a rezonátor közötti rés mérete volt, ami az irodalom szerint 500 nm körül optimális. A mi rendszerünkben ez, a mikrostruktúrába egyébként betervezett méret a gyakorlatban a szerkezet előhívása során megszűnt, vagyis a fényvezető szál és a rezonátor egymáshoz ért (41. ábra D, kis kép). Abban a ritka esetben azonban, amikor megmaradt a rés, az átcsatolás mérhetetlenül kicsi volt. Vagyis az egymáshoz érő polimer fényvezető és rezonátor volt a gyakorlatban megvalósítható és ebben az esetben jött létre valóban az átcsatolás.



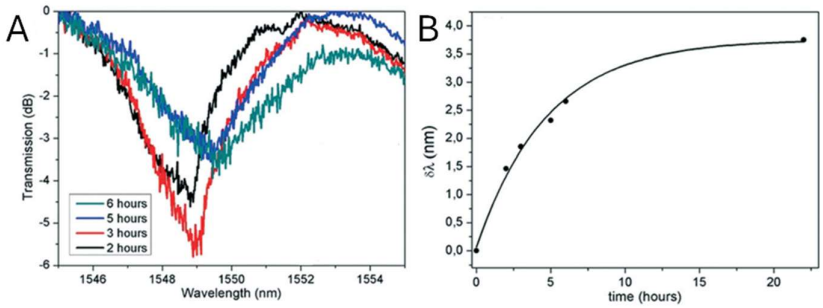
42. ábra. A WGM detektor kalibrálása. A: A detektor rezonancia spektrumának egy csúcsa különböző kalibráló glükóz oldat koncentrációval beállított törésmutatók esetében. B: A bemutatott csúcs eltolódásának mértéke a törésmutató változás függvényében.

A detektor mikrofluidikai csatornába való polimerizálásának első lépéseként megtöltöttem a kvarc tömb folyadékcsatornáját kb. 10 µL SU-8 fotopolimerrel, amit ezután 48 órán keresztül 95°C-on kezeltem, hogy az oldószer elpárologjon. A minta lézerrel történő megvilágítása után 95°C-os utósütés következett, majd egy egész éjszakán át az SU-8 előhívójában áztattam a mintát, hogy a zárt járatokból is kioldódjon a meg nem világított fotopolimer, végül etanollal átmostam és kiszárítottam a csatornát.

Ezután következett a szerkezet szenzorikai felhasználását lehetővé tévő bevonás, aminek a célja sztreptavidin fehérje detektálása volt. Ez egy biotinos réteg előállítását jelentette a korábban ismertetett módon, a keskeny csatornák miatt hosszabb mosási lépésekkel. Először CAN-nal kevert salétromsavas kezelés történt, majd PEG diaminnal felületi aminocsoportok kialakítása, végül pedig szulfo-NHS biotinnal egy biotinréteget hoztunk létre a rezonátoron. A biotinos funkcionalizálás sikerességét fluoreszcensen jelölt sztreptavidinnel ellenőriztük (41. ábra C, kis kép). Azt találtuk, hogy a keskeny csatornában is be lehet szelektíven vonni a

szerkezetet biotinnal, és a fluoreszcencia intenzitás alapján kb. ugyanolyan sűrűséggel, mint nyitottabb üveglapon.

Az elkészült detektorunk rezonancia spektrumának egy módusára példát a 42. ábra A mutat. A levegőben mért Q faktor $5*10^3$ volt, ami összemérhető más 3D technikával készült SU-8 eszközökével [164], de kissé elmarad az optimális 10^5-ös nagyságrendtől. A veszteségek részben szóródási jellegűek, részben pedig abból adódnak, hogy a rezonátor és a polimer fényvezető egymáshoz érnek és ezért direkt módon is csatolódik át fény. Az összeszerelt rendszerben (41. ábra D) a törésmutató változásra bekövetkező sáveltolódást ismert törésmutatójú glükóz oldattal kalibráltuk, és azt találtuk, hogy a változás lineáris, egy egységnyi törésmutató változásra kb. 61 nm eltolódás a válasz (42. ábra B), és körülbelül 0.005 egységnyi törésmutató változást képes a rendszer detektálni. A kalibrációt több alkalommal sikerült megismételni ugyanazon az eszközön annak károsodása nélkül.



43. ábra. Sztreptavidin fehérje érzékelése a WGM detektorral. A: A detektor rezonancia spektrumának egy kiválasztott csúcsa a sztreptavidinnel történő inkubáció alatt, néhány inkubációs időnél. B: A bemutatott csúcs eltolódásának mértéke az inkubáció idejének függvényében.

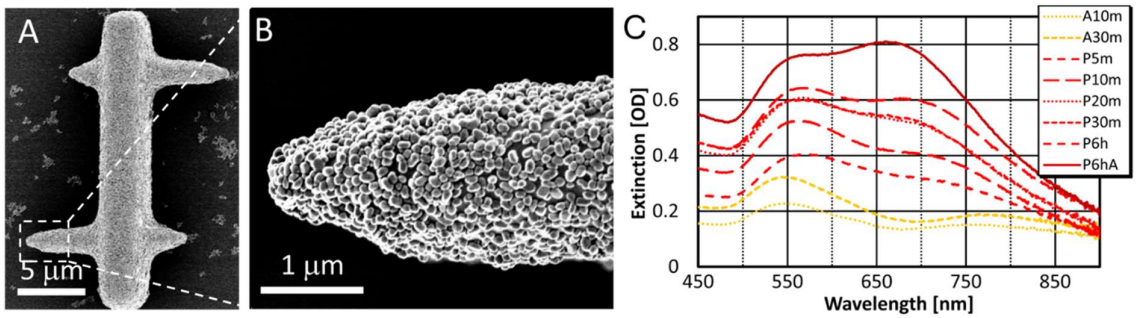
A detektor sztreptavidin fehérje érzékelését egy 500 nM-os fehérjeoldat segítségével jellemeztük. A biotinált detektorral ellátott csatornán először PBS-t áramoltattunk át, majd a fehérjeoldattal töltöttük fel azt. Ezután a feltöltést követő 2., 3., 5., 6. és 22. órában megmértük a rendszer spektrumát úgy, hogy minden mérés után 1 percig áramoltattuk a folyadékot, hogy friss oldat jusson a detektor köré. A kiválasztott sáv eltolódását követve (43. ábra A) egy telítési görbét kaptunk (43. ábra B), ami azt jelzi, hogy 22 óra alatt a maximálisan lehetséges mennyiségű fehérje kitapadt a rezonátorra. White és Fan alapján [165] a mért eltolódásból a minimálisan detektálható felületi fehérjekoncentráció változás kiszámolható, ami esetünkben $67*10^3$ STA/μm^2-nek adódott, a telítődés értékéből pedig a maximálisan a felületen kialakulni képes koncentráció $820*10^3$ STA/μm^2-nek. Ezek az értékek, főként az érzékenység kissé elmaradnak az elvárttól, de az őket meghatározó faktorok, pl. a csatorna geometriája, a kötési

affinitás vagy a mérési protokoll optimalizálásán keresztül véleményünk szerint javíthatók. Emellett az eszközünk előnyei közé tartozik annak hordozhatósága, könnyű kezelhetősége és a mérések reprodukálhatósága.

6.4. Lokális fluoreszcencia erősítés aranyozott polimer mikroszerkezetekkel

Az optikai csipesszel szabadon mozgatható SU-8 polimer mikroszerkezetek egyik érdekes továbbfejlesztési irányaként mobil fluoreszcencia erősítő eszközt kívántunk létrehozni. Ehhez a mozgatható eszközökön egy erősítésre alkalmas felületet kell lialakítani. Az erősítésre az irodalom szerint fém bevonatú nanostrukturált felületek, pl. fém nanorészecskék (metal nanoparticle, MNP) plazmonikus hatása megfelelő [166]. Magát az erősítés mechanizmusát számos publikációban tárgyalták már, a mi munkánk annak egy mobil mikroeszközzel történő megvalósíthatóságát mutatta be [167]. Munkánk publikálása előtt mikrofluidikai csatornában már valósítottak meg ezzel a módszerrel erősítést, de ez egyrészt nagy kiterjedésű volt, másrészt helyhez kötött[168, 169]. Ésszerűnek tűnt tehát, hogy a mikroszerkezetek alkalmazását a mobil fluoreszcencia erősítő platformok irányába fejlesszük, amelynek kis aktivált felülete révén lokálisan lehet elérni fluoreszcencia erősítést. A fém-erősített fluoreszcencia jelenségére a továbbiakban MEF-ként (Metal Enhanced Fluorescence) fogok hivatkozni. A fejlesztést meggyorsította, hogy a funkcionalizálásban eddig szerzett tapasztalatainkat a fém nanorészecskékkel történő bevonásban könnyedén kamatoztatni tudtuk. Az SU-8 szerkezetek bevonása a pozitív töltésű amino csoportokkal kiváló kiindulás azok MNP-kel történő bevonásához is, mivel ezek a legtöbb előállítási eljárás során negatív felületi töltést kapnak, és így elektrosztatikusan a felülethez tapadnak.

A mikroszerkezetek sztreptavidinnel történő első bevonási kísérleteivel párhuzamosan megmutattuk, hogy az APTES molekula által a felületen létrehozott pozitív töltésű aminocsoportok arany nanorészecskék (AuNP) kikötésére is alkalmasak [150]. A most tárgyalt munkákban a NP-k felülethez kötésére már PEG diamint használtuk, ami jóval nagyobb felületi sűrűséget eredményezett. Az AuNP-ket arany klorid oldatból Na-citráttal történő redukálással állítottuk elő, aminek következtében a NP-k felülete negatív töltésű lett, lehetővé téve a felülethez tapadást [151, 170]. A NP-k méretét a 10^{-2} % m/m koncentrációjú $HAuCl_4$ oldathoz adott Na-citrát mennyiségével változtattuk, így állítva elő 16 nm, 41 nm és 80 nm átmérőjű AuNP-ket.

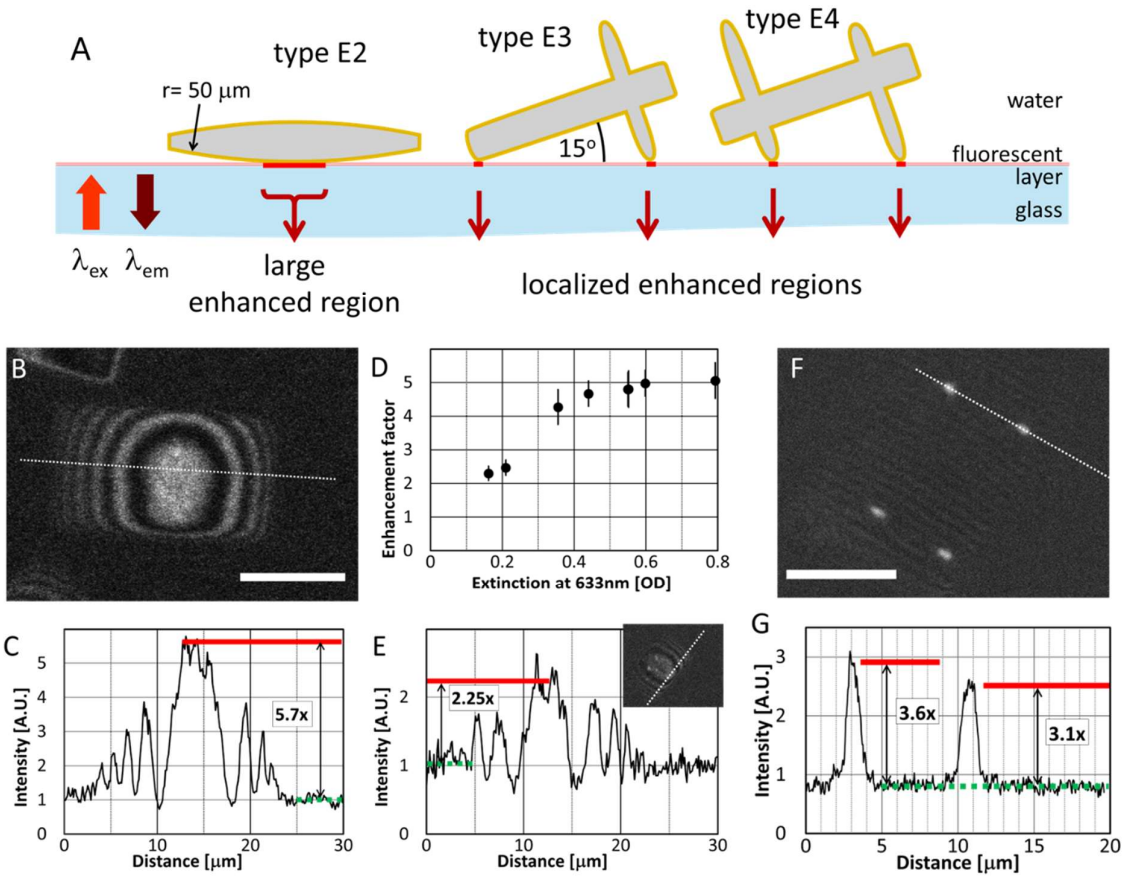


44. ábra. SU-8 mikroszerkezetek bevonása 80 nm-es arany nanorészecskékkel. A, B: Elektronmikroszkópos felvételek folytonos nanorészecske réteggel bevont szerkezetekről. C: Arany nanorészecskékkel bevont SU-8 felületek extinkciós spektrumai APTES és PEG-diaminnal amin-funkcionalizált felületekkel és eltérő nanorészecske inkubációs időkkel. A10m és A30m: APTES-sel kezelt és nanorészecskékkel 10 illetve 30 percig inkubált minta. P5m-P30m: PEG-diaminnal kezelt, és nanorészecskékkel 5-től 30 percig inkubált minta. P6h: PEG-diaminnal kezelt, plusz 6 órán át inkubált minta. P6hA: PEG-diaminnal majd ecetsavval kezelt, plusz 6 órán át inkubált minta.

Az MNP bevonás sűrűsége alapjaiban határozza meg az aktív felület tulajdonságait. A sűrűséget, és ennek az erősítésre gyakorolt hatását 80 nm átmérőjű NP-kel vizsgáltuk, így a következő eredmények csak ezekre vonatkoznak. Különböző ideig inkubálva a NP-kel az APTES és a PEG diamin kezelt felületeket, nagyon eltérő bevonási sűrűségeket értünk el. A legnyilvánvalóbb eredmény, hogy az APTES-sel kezelt felületre jóval kevesebb NP rakódik le egységnyi idő alatt, mint a PEG-esre: az előbbi 30 perces inkubációjával értünk el ugyanakkora (kb. 65 NP/µm^2) sűrűséget, mint az utóbbi 10 perces inkubációjával. A PEG diaminos felület 6 órás inkubációjával pedig közel 110 NP/µm^2 sűrűség volt elérhető, ami a felület további ecetsavas kezelésével 120 NP/µm^2 értékre volt növelhető. Ezek a felületi sűrűség értékek teljes felületi borítottságot jelentettek (44. ábra A, B) és tovább nem nőttek az inkubációs idővel. A bevonás sűrűsége megmutatkozott a felületek elnyelési spektrumában (44. ábra C), aminek az integrálja közel lineárisan nőtt a felületi sűrűséggel. Hasonló függést mutatott a bevont felületek reflexiója is a sűrűséggel, és a reflektancia 7% és 27% között változott.

Ami a bevonandó polimerizált SU-8 szerkezeteket illeti, azok alakját specifikusan a vizsgálandó jelenséghez terveztük (45. ábra A). A reflexiómáréshez egy, a hordozóhoz a nagyobbik felületével tapadt lapos téglatestet polimerizáltunk, amit nem választottunk el a felülettől. A többi eszközt a NP bevonás után eltávolítottuk az üveg hordozóról. A MEF módszer legfontosabb jellemzője, az erősítési tényező megállapításához fluoreszcensen jelült fehérjeréteget hoztunk létre egy üveg felületen, amelyre a NP bevonás után a polimerizálás helyéről eltávolított eszközöket pipettáztuk. A fehérjeréteget DyLight 650 vagy Cy3 fluorofórral jelölt sztreptavidin alkotta számolásaink szerint kb. másfél összefüggő

molekularétegben. A fluoreszcencia gerjesztés és detektálás az üveg irányából, alulról történt. Az eszközök véletlenszerű helyzetben kerültek ugyan a rétegre, de az alakjukból adódóan mindig úgy, hogy a vizsgálni kívánt részükkel érintkeztek vele (45. ábra A). A MEF erősítési tényező nagy felületen történő meghatározásához sík, valamint kissé hengeres (45. ábra A, E2 szerkezet) téglatesteket készítettünk, amelyek mindig a legnagyobb felületükkel érintkeztek a fehérjeréteggel. A MEF lokális erősítéséhez olyan téglatesteket polimerizáltunk (45. ábra A, E3 és E4 szerkezetek, 44. ábra A, B), amelyekből kis kontaktfelületű rudak álltak ki, és szinte mindig ezen rudak végeivel érintkeztek a felülettel.



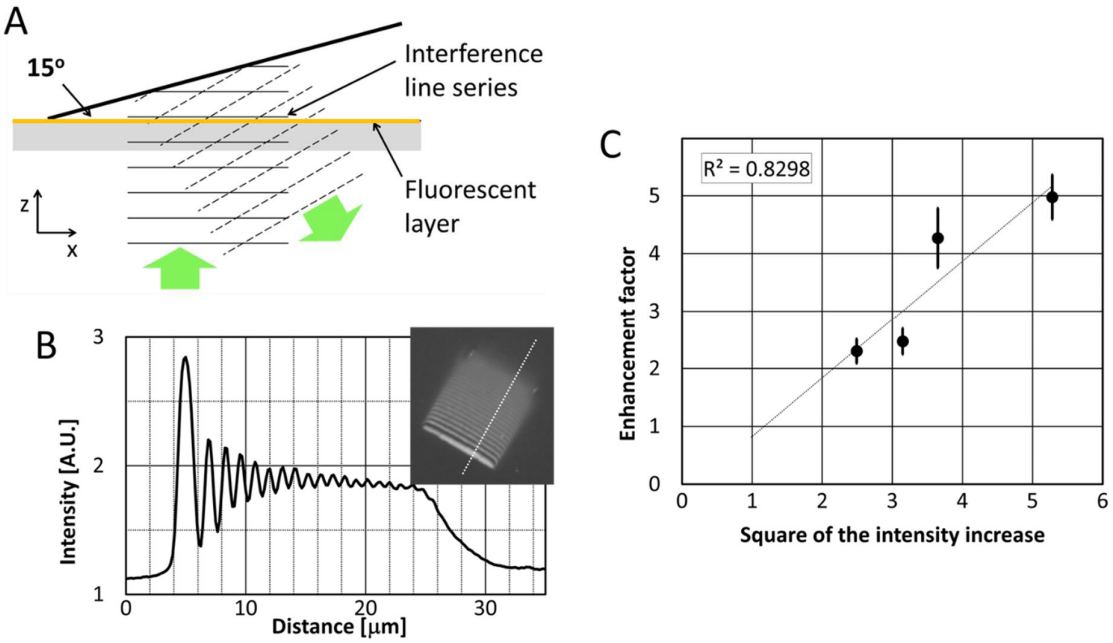
45. ábra. Fém-erősített fluoreszcencia. A: A fluoreszcencia erősítésre használt szerkezetek sematikus képei. A gerjesztés és a detektálás a hordozó üveg irányából történt. Az erősítést a fluoreszcencia réteg és a szerkezetek érintkezési pontjainál a vastagabb piros szín jelzi. B: E2 típusú, P6h bevonású szerkezettel erősített fluoreszcencia konfokális mikroszkópos felvétele DyLight 650 festékkel jelölt fehérje rétegen. Skála: 10 µm. C: A B ábrán látható felvételen a szaggatott vonal menti intenzitáseloszlás. D: A különböző mértékben bevont erősítő szerkezetekkel elért fluoreszcencia erősítés a szerkezetek 633 nm-en mért extinkciójának függvényében. E: E2 típusú, A10 bevonású szerkezettel erősített fluoreszcencia intenzitása a kis képen jelölt szaggatott vonal mentén. F: E4 típusú, P6h bevonású szerkezettel erősített fluoreszcencia konfokális mikroszkópos felvétele. Skála: 10 µm. G: Az F ábrán látható felvételen a szaggatott vonal menti intenzitáseloszlás.

A fluoreszcencia erősítés a DyLight 650 fluorofórra, a nagy kontakt felületű eszközökkel tekintve (45. ábra B, C) a 633 nm hullámhossznál mért extinkció értéke függvényében (45. ábra D) monoton módon növekedett. Az átlagos erősítés értéke kb. 5-nél telítődött a 6 órás NP inkubációval készített mintáknál, és a legmagasabb megfigyelt értéke 5.7-szeres volt (45. ábra C). Az erősítés egyik APTES-sel készített felület esetében sem volt magasabb 2.5-szeresnél (45. ábra E). További fontos megfigyelés, ami a jelenség magyarázatát is segítette az volt, hogy a hengeres felületű lapoknál a fluoreszcencia erősítés a lapka felülete mentén igen erős strukturáltságot mutatott (45. ábra B, C). Ez a megfigyelt fluoreszcencia intenzitásokban úgy is jelentkezett, hogy néhány helyen az kisebb volt, mint az a háttér, ahol a csupasz fehérje felett nem volt jelen az erősítő lapka. A fluoreszcencia erősítés lokalizáltan is megfigyelhető volt a hegyes végű, NP-kel bevont rudakkal (45. ábra F, G). Az értéke a 2.5-4 tartományba esett, az erősített terület alakja pedig követte a rúd végének enyhén elnyújtott alakját.

A szerkezeteket plazmonikus fluoreszcencia erősítés elérése reményében vontuk be arany NP-kel. A megfigyelt erősítés mintázata alapján azonban azt feltételezzük, hogy esetünkben nem ez volt az erősítés fő oka. Megfigyeltük, hogy a hengeres lapkák esetében olyan helyen is volt 3-4-szeres erősítés, ahol a felületi fluoreszcens réteg és a NP réteg között kb. 250 nm volt a távolság. Plazmonikus erősítés pedig az irodalom szerint néhányszor tíz nanométer NP-fluorofór távolság után szinte teljesen eltűnik [171, 172]. Továbbá, 15 fokban megdöntött sík lapú, NP-kel borított szerkezeteket is használtunk erősítésre (45. ábra A, E3 és E4 típus), amelyek esetében egy periodikus erősítés mintázatot figyeltünk meg a mintázat amplitúdójának csökkenésével abban az irányban, ahol a NP réteg távolodik a fluorfóroktól, több mikrométerre is a felülettől (46. ábra B). Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a megfigyelt erősítés nem plazmonikus eredetű, hanem a fluoreszcens réteg reflexiójából ered, ami visszaveri mind a gerjesztő, mind az emittált fényt [173, 174].

Magyarázatunk szerint, a beérkező és a NP rétegről visszavert gerjesztő nyalábok (46. ábra A) egy térbeli állóhullám mintázatot hoznak létre úgy, hogy a tükröző felületen annak minimuma van, az intenzitás maximumok pedig azzal párhuzamosan, a hullámhossz függvényében bizonyos távolságokban $d = \frac{\lambda}{2n\cos\ ^{o}}$ periodicitással. A NP rétegek reflektanciáját R = 7%-27%-nak mértük, amiből az $I_{max} = I_0\left(1+\sqrt{R}\right)^2$ összefüggéssel kiszámolható az I_0R intenzitású visszavert és az I_0 intenzitású bejövő gerjesztő fény interferenciájának maximumában az intenzitás a bejövő intenzitáshoz képest. Azt találtuk, hogy az intenzitás maximumokban a bejövő fény 1.58-2.3-szörös intenzitása lesz

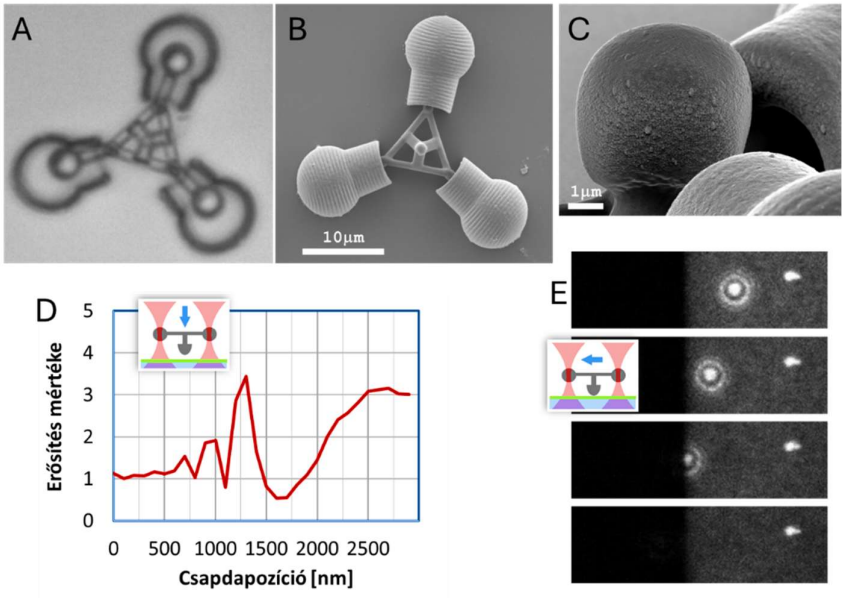
megfigyelhető (100% reflektancia esetén ez a szám 4 volna). Ez azonban nem tudja megmagyarázni a megfigyelt akár 6-szoros fluoreszcencia erősítést.



46. ábra. A fluoreszcencia erősítés eredete. A: Bejövő és visszavert nyaláb hullámfrontjai egy, a hordozó üveggel 15 fokot bezáró visszaverő felület esetében. B: Intenzitáseloszlás a kis képen jelölt szaggatott vonal mentén egy 15 fokkal megdöntött, arany nanorészecskékkel bevont E3 típusú szerkezet esetében (gerjesztés: 633 nm, emisszió: 672±20 nm). C: Az erősítés nagysága az arany nanorészecskével különböző mértékben bevont felületek reflektanciájából számolt intenzitás-növekedés négyzetének függvényében.

Feltételezhetjük azonban, hogy nem csak a gerjesztő, hanem az emittált fény is létrehoz visszaverődése révén hasonló intenzitás maximumokat. A fluoreszcens réteg által emittált és a nanorészecske réteg által visszavert fény interferenciája csak a koherenciahosszon belül jöhet létre, ami 670 nm hullámhosszt és 40 nm sávszélességet figyelembe véve kb. 3.7 μm, vagyis az 1 μm nagyságrendű NP-fluorofór távolságok esetében létrejöhet az emittált fény erősítése. Amikor tehát a gerjesztő fény interferencia maximuma pontosan a fluorofór rétegre esik, ott az eredeti bejövő fény által gerjeszthető emissziónál nagyobb intenzitású emissziót gerjeszt. Ez a gerjesztett fény pedig szintén erősödni fog a visszaverődés által szintén kb. ebben a távolságban, mivel a gerjesztő és az emittált hullámhossz közel van egymáshoz. Ezért a visszaverő réteghez legközelebbi maximumnál megfigyelt erősítés értéke a reflektanciából számolható intenzitás-növekedés négyzetétől lineárisan kell, hogy függjön. Valóban, ha ábrázoljuk ezt a két értéket azokra a mintákra, ahol van reflektancia adat, az adatpontokra egy közel 1-es meredekségű egyenes illeszkedik (46. ábra C).

A reflexió általi erősítés mechanizmusát támasztja alá a 15 fokban megdöntött ferde lapok esetében megfigyelt periodikus intenzitásmintázat is. A fluorofór rétegre merőlegesen beeső gerjesztő nyaláb a visszavert nyalábbal egy közel $d = 1\,\mu m$-es periodicitású interferencia mintázatot hozott létre a rétegen (46. ábra B). A $\theta = 15^o$ szög értékből és a periodicitásból a hullámhosszat a $\lambda = d \cdot n \cdot \sin(2\theta)$ egyenlettel visszaszámolva, a mintázatot egy 658 ± 44.7 nm-es nyaláb hozta létre, ami szinte pontosan a gerjesztő (633 nm) és az emittált (672 nm) hullámhossz számtani közepe. Ezek alapján kijelenthető, hogy a lokális fluoreszcencia erősítés alapvetően a gerjesztő és az emittált fénynek a reflektáló arany nanorészecske rétegen történő visszaverődéséből adódik. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy nem zárható ki a plazmonikus eredetű erősítés sem a mintánkban azokon a helyeken, ahol a NP-kel borított felület megfelelően közel (<50 nm) tud kerülni a fluorofórokhoz, de ez valószínűleg annyira lokalizált jelenség, hogy a képalkotó rendszerünk felbontása miatt nem mérhető.



47. ábra. Optikai csipesszel mozgatható, lokális fluoreszcencia erősítésre használható mikroszerkezetek. A mikroszerkezet optikai (A) és pásztázó elektronmikroszkópos képe (B). C: Egy fluoreszcencia erősítő mikroeszköz 3 µm görbületi sugarú, arannyal bevont fejrésze, ami a fluoreszcens réteggel érintkezik. D: Arannyal bevont mikroeszköznek egy fluoreszcens réteghez való közelítése közben megfigyelt maximális fluoreszcencia intenzitás a mozgató csapda pozíciójának függvényében. A közelítés a réteg normálisa irányából történt 100 nm-es lépésekkel. E: Fluoreszcens fehérje réteg fluoreszcens mikroszkópos képe, miközben a hozzá érintett, arannyal bevont mikroeszközt a réteg mentén optikai csipesszel, 2 µm-es lépésekkel pásztázzuk.

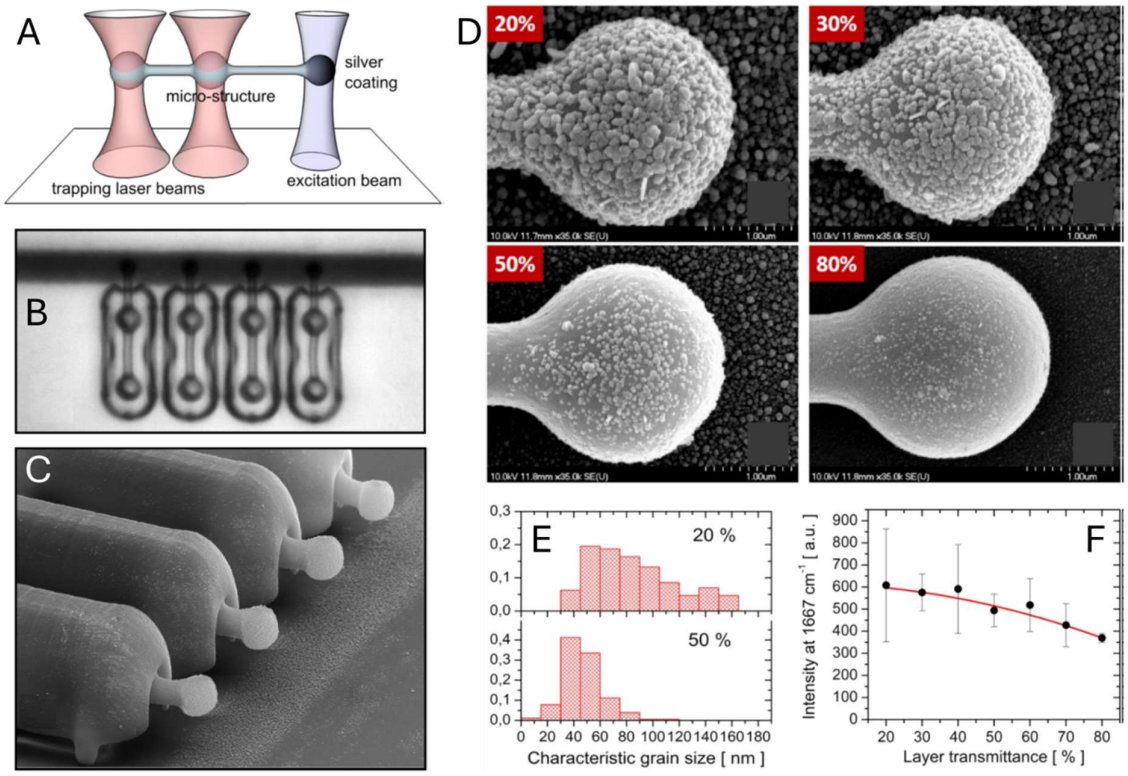
Optikai csipesszel mozgatható fluoreszcencia erősítő szerkezetek alkalmazását eddig még nem publikáltuk, így azokat kapcsolódó érdekességként mutatom be. Optikai csipesszel három ponton megragadható szerkezeteket készítettünk, melyeknek az erősítésben résztvevő

része a háromszöget alkotó csapdázó gömbök között volt (47. ábra A, B). Ezekre a szerkezetekre nem nanorészecskéket választottunk le az erősítő felületként, hanem katódporlasztással hoztunk létre rajtuk egy arany filmet (47. ábra C). A három csapdázó gömböt egy-egy fóléjük polimerizált burkolat védte meg attól, hogy arany rakódjon rájuk, ami a csapdázást ellehetetlenítette volna (47. ábra A, B). Az arany bevonás után a szerkezeteket a burkolattal együtt egy üveg mikrokapillárissal letörtük a helyükről, majd egy Cy3 fluorofórral jelölt fehérjeréteggel bevont üveglapra pipettáztuk. Két pásztázást végeztünk a csapdázott szerkezetekkel: az egyikben a fehérjeréteg felé közelítettük őket, hogy az erősítés távolságfüggését meghatározzuk, a másodikban pedig a felülettel párhuzamosan pásztáztunk különböző fluoreszcencia intenzitású területek fölött. Azt tapasztaltuk, hogy az erősítés mértéke erősen távolságfüggő, és hasonlóan periodikus változást mutat, mint a statikus szerkezeteknél, a maximuma pedig eléri a 3.5-öt (47. ábra D). A fehérjeréteggel párhuzamos pásztázás (47. ábra E) pedig azt mutatta meg, hogy az eszköz alkalmas nagyon csekély fluoerszcenciával rendelkező területekről erősített jelet rögzíteni; ugyanakkor, az erősítés mértéke a gyakorlati alkalmazáshoz még növelésre szorul.

6.5. Mobil mikroeszköz felületerősített Raman spektroszkópiához

Nemesfém nanorészecskékkel nem csak fluoreszcencia, hanem Raman erősítést is meg lehet valósítani, ráadásul ebben az esetben az erősítés elvileg több nagyságrendet is elérhet [175, 176]. Egy kooperációs munka keretében optikai csipesszel ténylegesen mozgatható, Raman erősítésre alkalmas mikroeszközt készítettünk és demonstráltuk annak használhatóságát [177]. Célunk az volt, hogy egy mikrofluidikai csatornában optikai csipesszel mozgatható, tetszőleges helyen Raman erősítésre képes szerkezetet állítsunk elő. A felületerősített Raman spektroszkópiával (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) kapott jel erősítésének egyik feltétele, hogy a mérendő molekula néhány nanométeren belül legyen a nanorészecske felszínétől. Ezért az eszközünket nem úgy tudjuk alkalmazni, hogy egy adott felületre eleve felvitt molekularéteg jelét erősítsük fel a hozzá nyomott, NP réteggel bevont szerkezettel, hanem hogy az oldatban lévő molekulák jelét erősítsük fel azáltal, hogy azok a NP rétegre kitapadnak. A tervezett szerkezeteinknek két része volt (48. ábra A): az első két csapdázó gömbből állt, aminél fogva a szerkezetet mozgatni lehet, a másik pedig az a része az eszköznek, amit a NP-kel bevonunk, és amit a Raman gerjesztő nyalábbal megvilágítunk. Ezt a részt kétféleképpen készítettük el, hogy megvizsgálhassuk a SERS platform területének

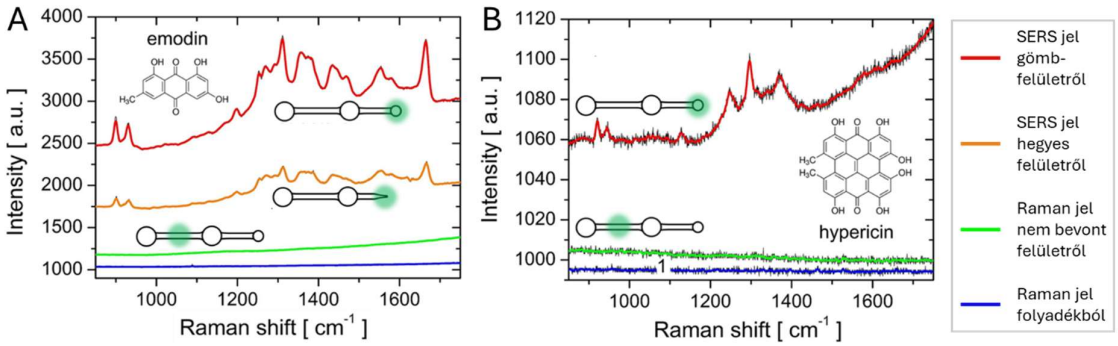
hatását az erősítésre: a szerkezetek egyik csoportjában a platform egy gömb volt, a másikban pedig egy, a vége felé elvékonyodó rúd.



48. ábra. Mobil SERS platform tervezése, készítése és alkalmazása. A: A SERS platform használatának sematikus vázlata. B: Ezüst nanorészecskékkel szelektíven bevont polimerizált SERS platformok optikai (B) és elektronmikroszkópos (C) képe. A felső sötét sáv a B képen a leválasztott ezüst nanorészecske réteg. D: Ezüsttel különböző mértékben bevont gömb végű platformok elektronmikroszkópos képei a 20%, 30%, 50% és 80% transzmittancia értékek esetében. E: A 20% és 50%-os transzmittanciával készített nanorészecskék méreteloszlásai. F: Emodin SERS spektruma egyik kiválasztott sávjának intenzitása a nanorészecske réteg transzmittanciájának függvényében.

A polimerizált szerkezet csapdázó gömbjeit az előző, nem publikált munkánkhoz hasonlóan itt is beborítottuk egy burokkal, hogy a fém NP-k ne tapadjanak rájuk (48. ábra B, C). A SERS erősítésre alkalmas részt ezüst NP-kel (AgNP) vontuk be ezüst ionok fotoredukciójával. Ehhez a szerkezeteket tartalmazó szubsztrátot egy 1 mM-os ezüst nitrátot és 0.7 mM-os Na-citrátot tartalmazó vizes oldatba merítettük. A szerkezeteket ezután lokálisan megvilágítottuk egy 532 nm-es lézer fényével (8 mW) úgy, hogy egy hengerlencsével csík alakban fókuszáltuk a fényt a szerkezetek nem beburkolt részére. Ezzel egyszerre négy, egymás mellé polimerizált szerkezetet tudtunk bevonni ezüsttel. A bevonás mértékét és a NP-k méretét, egymástól nem függetlenül, a megvilágítás idejével változtattuk, úgy, hogy közben mértük a mintán átmenő 532 nm-es fényt. A hosszabb megvilágítás kisebb átmenő fényintenzitást

eredményezett. Az ezüst leválasztással 20% - 80% transzmittanciával jellemezhető ezüst rétegeket kaptunk. Az 50%-os rétegek jellemzően 50 nm-es NP-ból álltak, a 20%-osak pedig 50 nm és 150 nm közöttiekből (48. ábra D, E).



49. ábra. Emodin (A) és hipericin (B) Raman spektrumai erősítéssel és anélkül. A SERS spektrumokat az ezüsttel bevont végén mértük a szerkezeteknek, az erősítés nélküli Raman spektrumokat vagy a nem bevonatos részen vagy a folyadékban (zöld körök).

A Raman méréseket egy Horiba Jobin Yvon iHR 550 spektrométer mellé épített optikai csipesz rendszeren, az emodin nevű rákellenes hatóanyag és a fotodinamikus terápiában használt érzékenyítő anyag, a hipericin vizes oldataiban végeztük el. A SERS platformokat az emodin 1 µM-os oldatába merítettük, optikai csipesszel megfogtuk, a Raman gerjesztő nyaláb fókuszába vittük, majd az AgNP-kel aktivált részét megvilágítottuk. A gerjesztő fény egy 488 nm-es, 20 µW-os nyaláb volt, az integrációs idő 60 s. Ezzel a lézerintenzitással történő megvilágítás nem befolyásolta a szerkezet csapdázását. Kontrollként a szerkezet NP-kel nem bevont részén is mértünk Raman spektrumot, illetve az oldatban is. Egyértelműen megállapítottuk, hogy értékelhető Raman spektrumot csakis abban az esetben lehet mérni, ha a NP-kel bevont részt gerjesztettük, a másik két esetben a spektrumok nem mutatnak semmilyen csúcsot (49. ábra A). A gömb alakú SERS platformmal kb. 2x nagyobb mértékű erősítést regisztráltunk, ami valószínűleg annak volt köszönhető, hogy a másik platform keskenyebb volt a Raman gerjesztő nyaláb átmérőjénél, vagyis annak egy része nem a NP-ket világította meg, hanem az oldatot. A NP-k borítottságától is függött a regisztrált Raman spektrum amplitúdója: a nagyobb borítottsággal és mérettel jellemezhető kisebb transzmittanciájú minták erősítése volt jellemzően a nagyobb (48. ábra F). Ez a növekmény azonban nem volt arányos a transzmittanciával, mivel a megfigyelt változás valószínűleg a méret és a borítottság kombinált hatásának az eredménye. Úgy gondoljuk, hogy a kis transzmittanciájú mintáknál a nagy részecskeméret már meghaladta azt, ami legnagyobb erősítést adta volna, azonban a nagyobb borítottság összességében mégis nagyobb erősítést

eredményezett itt. A 10 μM-os koncentrációjú hipericin molekula méréshez a gerjesztő fény egy 532 nm-es, 6 μW-os nyaláb volt. Raman jelet itt is csak az ezüsttel bevont felületről kaptunk (49. ábra B), de az amplitúdója kisebb volt, ami valószínűleg a csekélyebb számú felületre tapadt molekulának volt betudható.

A SERS platformok erősítésének mértékét nem tudtuk közvetlenül meghatározni, mivel a NP-kel nem bevont területekről nem tudtunk Raman spektrumot mérni. Ezért szakirodalmi leírások alapján, citrát redukcióval készített ezüst nanorészecske rétegen mért Raman spektrumok segítségével próbáltuk az erősítés nagyságát megbecsülni. Ezzel a standard módszerrel az erősítés értékét mások 10^5-10^6-nak mérték. Az ilyen AgNP-ken mi átlagosan kb. 5-ször nagyobb intenzitású Raman spektrumokat regisztráltunk, mint a mikroszerkezetek SERS platformjaival, vagyis azt találtuk, hogy az eszközünk erősítése csak kis mértékben marad el a klasszikus módszerétől. Összességében a bemutatott mobil mikroeszközök alkalmasnak bizonyultak a kitűzött cél elérésére: mikrofluidikai környezetben tetszőlegesen mozgathatók és megfelelő mértékű, több nagyságrendnyi erősítést biztosítanak nagyon kis koncentrációjú anyag Raman spektrumának méréséhez.

6.6. Összegzés

1. 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 köztes szilán vagy PEG alapú, amin csoportot tartalmazó összekötő molekula alkalmazása követett, majd ehhez kapcsolódott a fehérjét megkötő molekula. A felületeket specifikus módon sztreptavidin fehérjével vontam be, amihez a fehérjét megkötő molekula biotin volt. A nem specifikus esetben glutáraldehidet alkalmaztam fehérjét megkötő molekulaként. Meghatároztam a fehérje bevonat felületi sűrűségét, ami megmutatta, hogy a PEG összekötő molekulákkal a specifikus esetben közel tízszer nagyobb felületi koncentrációt lehet elérni, mint a szilán alapúval, és hogy ehhez a második esethez hasonló koncentrációkat lehet elérni a nem specifikus bevonással.

2. Eljárást dolgoztam ki nem letapadó egyedi sejtek polimerizált és fehérjével bevont mikroeszközökkel történő indirekt optikai manipulációjára. Az eljárás első lépéseként a sejteket egy optikai csipesszel megfogott szerkezethez kell tapasztani, majd ezt követően lehet azt a szerkezet segítségével a csipesszel mozgatni. A módszer egyik megvalósításában a mikroeszközöket sztreptavidinnel vontam be, és a sejtek membránjához kötött biotin segítségével kapcsoltam a szerkezethez. A másik megvalósításban a mikroszerkezeteket

konkanavalin A fehérjével vontam be, ami a sejtek natív membránjához kötődik, így azokat kezelés nélkül lehet a szerkezetekhez tapasztani. Kísérletileg összehasonlítottam kétféle csapdázó szerkezetet, és megmutattam, hogy a hat szabadsági fokú mozgatás a szerkezet olyan kialakítása mellett lehetséges, amikor a csapdázott sejt a csapdapozíciók alkotta síktól távol esik.

3. 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 képes kimutatni a kívánt fehérje jelenlétét. A fehérjeérzékelést a detektor rezonátor korongjának a fehérjére specifikus bevonásával értem el. A működést sztreptavidin fehérje kimutatásával demonstráltam.

4. Fluoreszcencia és Raman erősítésre alkalmas, optikai csipesszel mozgatható mikroeszközöket készítettem SU8 fotopolimer mikroszerkezetek arany és ezüst nanorészecskékkel történő bevonásával. A fluoreszcencia erősítésben résztvevő terület mérete a szerkezetek alakjával változtatható. Arany nanorészecskékkel bevont rétegekkel maximálisan 5-szörös fluoreszcencia erősítést értem el, aminek a legkisebb kiterjedése körülbelül 1 μm^2 volt. Megállapítottam, hogy a fluoreszcencia erősítés eredete az arany nanorészecske rétegről visszaverődő és a beérkező nyalábok interferenciája, amely hatás mind a gerjesztő, mind az emittált fényre fellép. A Raman erősítést ezüst nanorészecskékkel csak előre meghatározott helyeken bevont és optikai csipesszel szabadon mozgatható mikroeszközökkel valósítottam meg. Megállapítottam, hogy erősítés csak a szerkezetek bevonattal rendelkező részén jön létre, mértéke pedig függ a nanorészecskék méretétől és felületi sűrűségétől.

Releváns publikációk

Aekbote BL. et al. EUR. POLYM. J. 48:1745-1754. (2012)
Aekbote BL. et al. BIOMED. OPT. EXPR. 7:45-56. (2016)
Vizsnyiczai G. et al. SPIE PROC 9922: 992216. (2016)
Vizsnyiczai G. et al. BIOMED OPTICS EXPRESS 11:945-962. (2020)
Kelemen L. et al. LAB CHIP 19:1985-1990. (2019)
Aeobote BL. et al. OPT. MATER. 38:301-309. (2014)
Vizsnyiczai G. et al. LANGMUIR 31:10087-10093. (2015)

7. Egyedi sejtek jellemzése polimer mikroeszközökkel

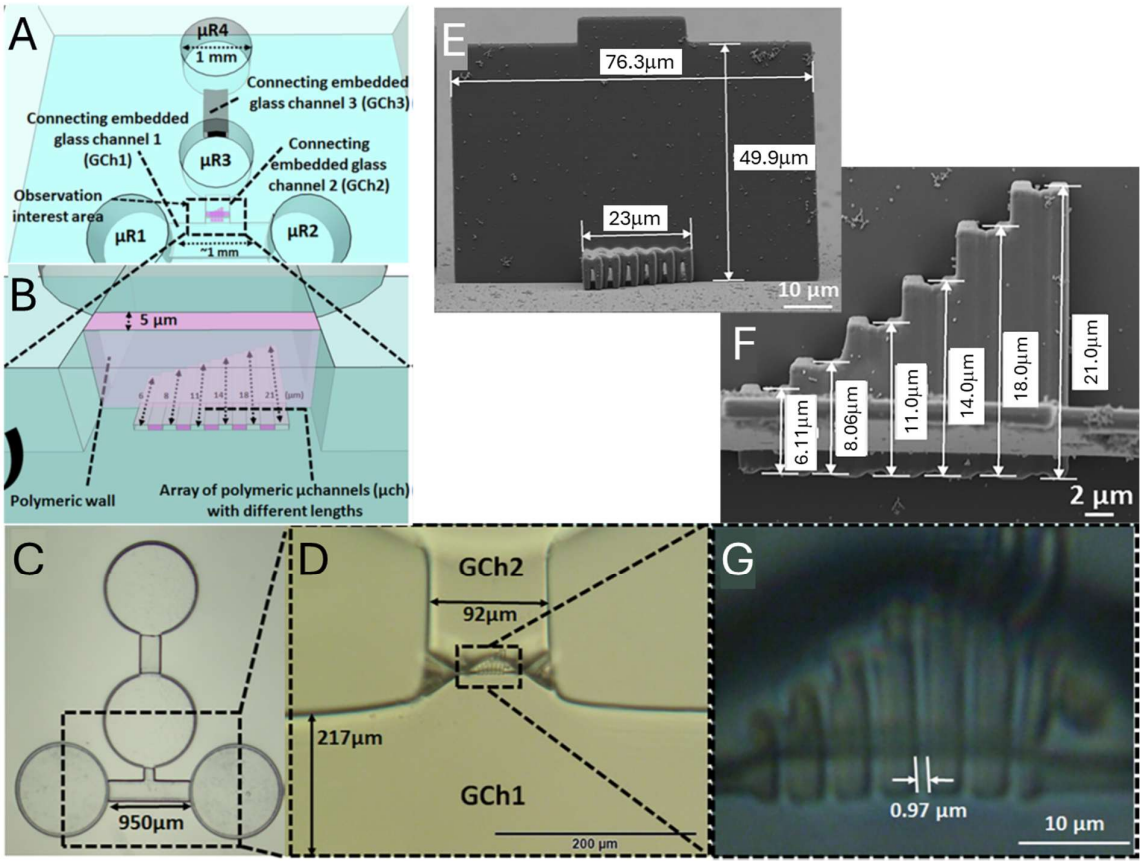
Mind a szubtraktív, mind az additív lézeres mikrofabrikáció kiválóan alkalmas olyan, specifikus mikrokörnyezet kialakítására, amelyben sejtek élettani folyamatait jól kontrollált módon lehet vizsgálni [44, 178]. Ezenkívül, a mozgó mikroszerkezetek is ígéretes eszközöknek tűnnek arra, hogy korábban nem lehetséges módon vizsgáljunk egyedi sejteket. Míg a mikrofluidikai rendszerbe integrált mikrokörnyezetekre korábban már több példa volt, mozgó mikroeszközöknek sejtek vizsgálatára való alkalmazása ritkaságszámba megy. Ebben a fejezetben bemutatom az egyedi sejtek jellemzéséhez készített mikroeszközeinket, valamint a velük elért eredményeinket. Elsőként egy rákos sejtek migrációjának vizsgálatára alkalmas, mikrofluidikai csatornába integrált passzív struktúrát mutatok be, majd kétféle, egyedi sejtek mechanikai tulajdonságait, illetve azok sejtfelszíni receptoraihoz való kötés erősségét vizsgáló mobil mikroeszközt.

7.1. Sejtmigráció vizsgálata mikrocsatornákkal

A rákos sejtek kutatásában fontos részterület azok áttétképzése, ezen belül is annak vizsgálata, hogy miként képesek az érfalon keresztül bejutni a sejtek közötti térbe. Az érfal nyilvánvalóan fizikai gátat is képez, ahol a sejtek gyakran szub-mikrométeres nyíláson haladnak át. Ilyen fizikai gátnak egy modelljén keresztül történő sejtmigrációt vizsgáltunk egy japán kooperáció keretében [179]. A korábban az irodalomban bemutatott, néhány mikrométeres pórusokkal működő eszközökkel szemben [180] a mi célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a szub-mikrométeres nyílásokon való áthaladás hatásait. Ezek a nyílások a kísérletekben két térrészt választanak el, ahol az egyikben a sejteket helyezik el, a másikba pedig valamilyen kemoattraktánst juttatnak, aminek hatására a sejtek arra az oldalra igyekeznek átjutni a nyílásokon keresztül. Korábban a folyamat közben megfigyelték a sejtmag dezintegrációját, a DNS károsodását, majd a másik oldalon a sejtmag újbóli kialakulását és molekuláris szintű DNS helyreállítási folyamatokat [180].

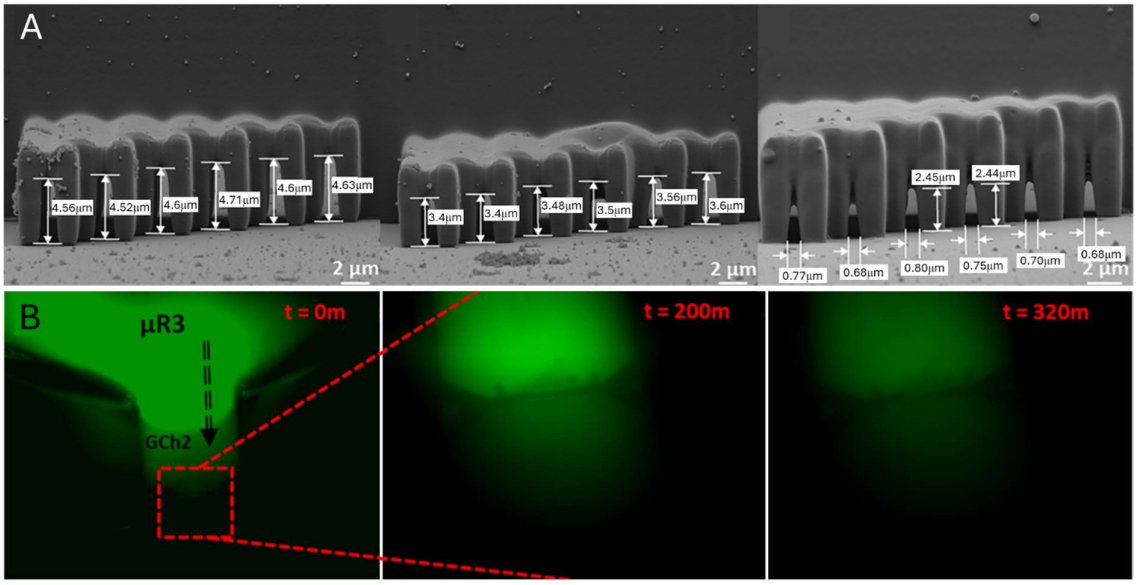
Célunk egy integrált mikrofluidikai rendszer kialakítása volt, amelyet kevés lépést igénylő, ultragyors lézeres mikrofabrikációs módszerekkel készítünk, nevezetesen lézeres marással és TPP-vel. A csatornarendszert a kooperációs partnerünk készítette fényérzékeny Foturan üvegből. A megfelelő útvonalon történő megvilágítás és hőkezelés után az üvegből HF oldattal marták ki a megvilágított térfogatot, kialakítva felülről nyitott μR1-μR4 tartályokat és az azokat összekötő zárt csatornákat (50. ábra A). Ebbe a csatornarendszerbe, a bekeretezett

helyre polimerizáltam egy térelválasztó elemet, valamint a térelválasztóba integrált, adott hosszúságú és keresztmetszetű mikrocsatornákat (50. ábra B). A két térrész csak a térelválasztó alján, a csatorna alsó üveg falán elhelyezkedő mikrocsatornákon keresztül tud kommunikálni (50. ábra G). A térelválasztó elem egy kb. 2 µm vastag, kb. 80 µm széles és 50 µm magas fal volt, kétoldalt egy-egy stabilabb, 10 µm vastag, V-alakú tartóval, amivel a vékony térelválasztó az üveg oldalfalhoz tapadt (50. ábra D). A mikrocsatornák szélessége, magassága és hossza változtatható paraméter volt: a szélesség 0.7 µm és 1.3 µm között volt, a magasság 2.5 µm és 4.5 µm között, a hosszt pedig 6 µm és 21 µm között változtattuk. A méreteket pásztázó elektronmikroszkóppal ellenőriztük (50. ábra E, F, 51. ábra A).



50. ábra. A sejtmigrációs mikrofluidikai rendszer tervezése és elkészítése. A: A mikrofluidikai rendszer vázlatos képe a µR1-µR4 tartályokkal, a köztük lévő csatornákkal és a mikrocsatornák elhelyezkedése. B: A térelválasztó fal és a mikrocsatornák elhelyezkedése az A ábra bekeretezett területén. C: A mikrofluidikai rendszer felülnézeti optikai mikroszkópos képe. D: A mikrocsatorna rendszer és az elválasztó fal optikai mikroszkópos képe a folyadékcsatornában. A térelválasztó fal (E) és a mikrocsatorna rendszer (F) elektronmikroszkópos képe a jellemző méretekkel (F ábra: a csatornák hosszai).

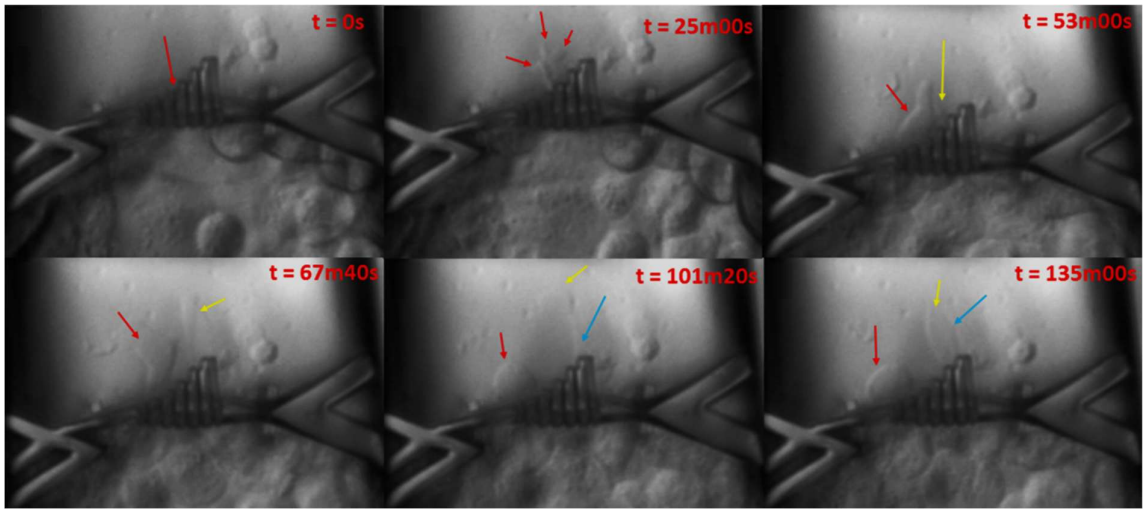
A térelválasztó falak zárásáról fluoreszcens festékkel bizonyosodtunk meg. A µR4 üregbe pipettázott fluoreszcein festék kb. 5 perc alatt ért el a µR3-on keresztül a térelválasztó falig, majd a mikrocsatornákon keresztül diffundált rendkívül lassan a másik oldalra. A két oldal közötti koncentráció gradiens bár idővel csökkent, de több órán keresztül fennmaradt (51. ábra B), ami azért fontos, mert a megfigyelni kívánt, gradiens-vezérelte folyamatok is ilyen időskálán játszódnak le. A kísérlet során epidermális növekedési faktort (Epidermal Growth Factor, EGF) alkalmaztunk kemoattraktánsként (200 ng/mL és 20 ng/mL sejttenyésztő médiumban feloldva), és szükséges volt, hogy ennek a koncentrációja a kísérlet teljes ideje alatt jelentősen magasabb legyen a sejtmentes oldalon. A mérésekhez egy prosztata rák sejtvonalat, a PC3-at használtuk.



51. ábra. A mikrocsatorna rendszer és annak diffúziógátló funkciója. A: Különböző magasságú és szélességű mikrocsatornák elektronmikroszkópos képei. A harmadik csoportban látható, hogy a szélesség 0.7 µm körül is lehet. B: A mikrofluidikai rendszerbe injektált fluoreszcein terjedése egymást követő fluoreszcens mikroszkópos felvételeken. A fluoreszcein kezdetben (t=0m) csak a mikrocsatornák µR3 tartály felőli oldalán van jelen, de 200 perc elteltével (t=200m) már az ellentétes oldalon is látható. 320 perc elteltével (t=320m) a koncentráció különbség még jelen van, de a korábbinál csekélyebb.

A japán laborban elvégzett sejtes mérések a következő protokoll szerint zajlottak. PC3 sejteket helyeztek a µR1 és µR2 üregekbe, majd a konfluencia állapotáig nevelték azokat normál sejtszérumban, ami tápanyagként szarvasmarha magzati szérumot (FBS) is tartalmazott. Ezután, közvetlenül a migrációs kísérleteket megelőzően 8 vagy 13 óra időtartamra a sejtektől megvonták az FBS-t. A migrációs kísérletek kezdetén a µR4 üregbe adtak sejttenyésztő médiumban oldott EGF-et (FBS-sel vagy FBS nélkül), majd megkezdték a

sejtek több órás megfigyelését. Az eredmények azt mutatták, hogy ha az EGF-et olyan oldatban oldották fel, ami FBS-t is tartalmazott, a sejtek nem közelítették meg a csatornát, vagy ha igen, nem keltek át rajta, bármennyi ideig is vonták meg tőlük a táplálékot a kísérlet előtt. Ha ellenben az EGF mellett nem volt FBS, akkor a 13 óráig táplálék-megvont sejtek átkeltek a csatornákon.



52. ábra. A sejtek áthaladása a mikrocsatornákon. Optikai mikroszkópos felvétel sorozat a mikrocsatorna rendszeren keresztül az alsó területről a felsőre történő sejtmigrációról. Részletes magyarázat a szövegben található.

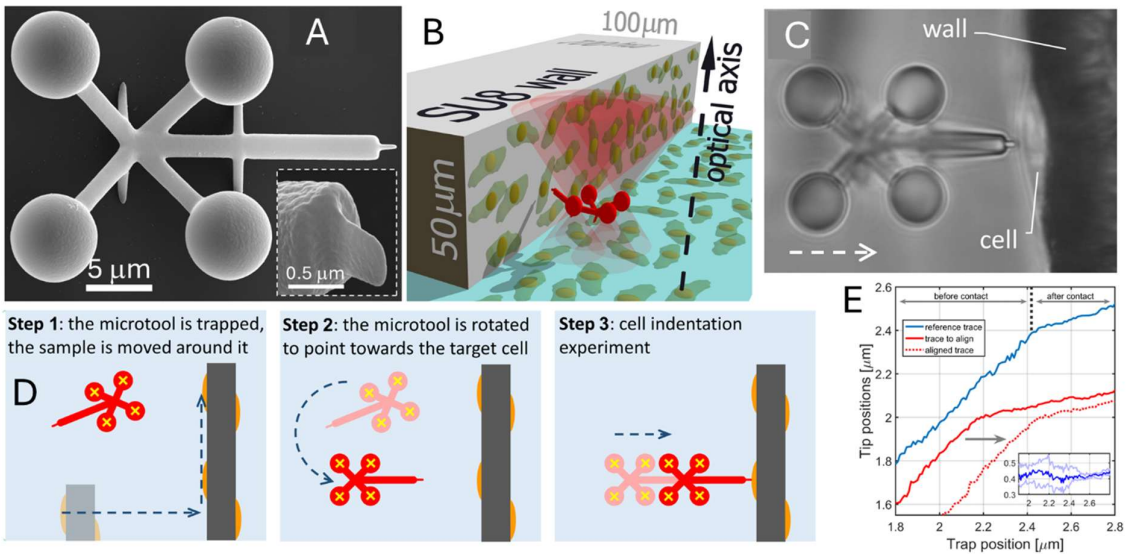
A legfontosabb megfigyelésünk az volt, hogy az átkelés során a sejtek nagymértékű alakváltozáson mentek keresztül. Néhány jellegzetes példa jól leírja az igen jelentős alakváltozásokat. Az egyik mérés során például (52. ábra), a piros nyíllal jelölt sejt 25 perccel az EGF hozzáadása után megjelent a 11 μm hosszú csatorna másik oldalán úgy, hogy közben több darabra esett szét. A 67. percnél a sejt azonban már ismét egy egységet alkotott. 101 perc után a 21 μm hosszú csatornán is átkelt egy sejt, szintén több darabra szakadva (kék nyíl). Ez a sejt 135 perc után újra egyesült, és érdekes módon úgy tűnt, hogy egy másik csatornán, korábban átkelt sejt (sárga nyíl) egyes részeit is magába integrálta. Kísérleteinkkel megmutattuk, hogy a PC3 sejtek az 1 μm-nél keskenyebb, kb. 3 μm magas fizikai gáton is képesek átkelni akár annak árán is, hogy közben több darabra esnek, majd képesek újra egyesülni, esetenként másik sejt darabjaival is. Az integrált sejtmigrációs platformunk több kísérlet elvégésére is alkalmas volt, és mivel zárt csatornák alkotják, a használt médiumok nem párolognak el a több órás megfigyelés során, és nem utolsó sorban biztonságosan használható. Optikai tulajdonságai pedig lehetővé teszik a lezajló sejtszintű folyamatok jó optikai felbontású megfigyelését.

7.2. Egyedi endotél sejtek rugalmasságának mérése

Az előző fejezetben bemutatott statikus mikroszerkezet mellett készíthetők aktívan mozgatott eszközök is a sejtek néhány mikrométeres mérettartományában, amelyekkel egyedi sejteket lehet valamilyen szempont szerint jellemezni. Az irodalomban találunk példát sejtek mikroeszközökkel segített egyszerű mozgatására [107, 181, 182], sejtközösség kialakítására [183] vagy pl. sejtmembrán kilyukasztására [184, 185]. Saját eredményünk e téren a később részletesen bemutatandó egyedi sejt indirekt manipulációja [153] és az ezzel a módszerrel segített mikroszkópos leképezés javítása [161]. A sejtek mechanikai tulajdonságai, azon belül elsősorban membránjuk rugalmassága fontos jellemzői a sejtek fiziológiai állapotának, amelyek kóros elváltozás esetén jelentősen megváltozhatnak. A rugalmasság jellemzésére atomerő mikroszkópiát (AFM) már régóta használnak [186-188], de bizonyos megkötésekkel az optikai csipesz is alkalmas erre a célra [189-191]. A rugalmasságot számszerűsítő Young-modulus AFM-mel a sejtmembrán normálisa irányából történő benyomással mérhető. Meghatározásához ismerni kell a benyomó felület görbületét, a benyomódás mértékét és az ahhoz szükséges erőt. A következőben ismertetett munkában egy általunk bevezetett, optikai csipesszel mozgatott mikroszerkezettel történő sejtrugalmasság mérési módszert mutatok be adherens, tehát felülethez lapult sejteken [192].

A komplex mikroszerkezettel történő Young-modulus mérésnek mind az AFM-mel, mind a korábbi optikai csipeszes kísérletekben használt mikrogolyókkal szemben vannak előnyei. Az AFM-mel összehasonlítva, a benyomáshoz szükséges erőket terjeszti ki a néhány tized pikonewtonos tartományra az AFM minimálisan 5-10 pN-jával szemben. Az optikai csipeszt használó mikrogolyós mérések esetében a kísérletek újszerű geometriája biztosít előnyöket. Az irodalomban bemutatott elrendezések esetében a legfeljebb néhány (<5) mikrométer magas sejteket az optikai tengelyre merőleges szubsztrátra tapasztják, és a csapdázó nyalábbal tartott 2-5 μm átmérőjű mikrogolyót az optikai tengely irányából nyomják neki. Ez a mozgatás a szilárd alátámasztást biztosító hordozó felület irányába hoz létre benyomódást. Ennek az elrendezésnek két hátránya van: az optikai tengely irányában jóval

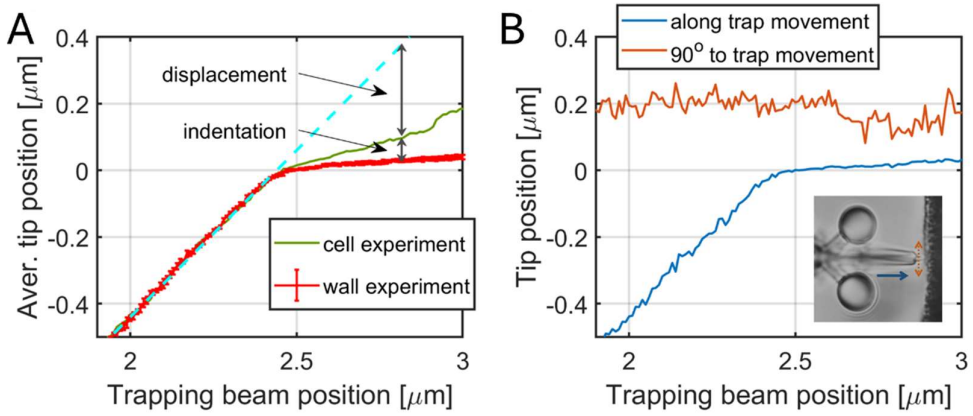
kisebb csapdaerő fejthető ki, mint a laterális irányban, illetve, hogy a csapdázó nyaláb mindenképpen áthalad a vizsgált sejten, annak potenciális károsodását okozva.



53. ábra. Endotél sejtek rugalmasság-mérésének elrendezése. A: Az optikai csipesszel mozgatott mikroeszköz felülnézeti elektronmikroszkópos képe. A négy gömböt az optikai csipesszel való megragadáshoz és a pozíciómeghatározáshoz használtuk. A kis képen az eszköznek a sejttel érintkező hegye látható. B: A mikroeszköz, a sejteket tartó SU-8 tömb, és a sejtek sematikus elrendezése az üveg hordozón a mintában. C: Egy tényleges kísérlet optikai mikroszkópos felvételének egy képkockája. A szaggatott vonal a szerkezet mozgatási irányát jelöli. D: A szerkezet megragadásának, a kiválasztott sejthez mozgatásának és a sejtmembrán benyomást végző kísérletnek a folyamata. E: Az eltérő mérések során kapott pozíció görbék egymáshoz igazításának illusztrálása. A kis képen a referencia görbe és egy eltolandó görbe különbségei láthatók három különböző mértékű eltolás esetén. Az eltolás mértékét a legkisebb varianciával jellemezhető különbség görbe adta meg.

Az általunk bevezetett elrendezés sémája az 53. ábra B paneljén látható. Újdonsága a mikroszerkezet alkalmazásán kívül, hogy az adherens, lapos sejteket nem a szubsztrátra, hanem egy, az optikai tengellyel párhuzamos („függőleges”) falra növesztettük, a szerkezetekkel pedig laterális irányból közelítjük meg őket és okozunk rajtuk benyomódást. Ekkor a rendelkezésre álló optikai erő nagyobb, mintha ugyanezzel a szerkezettel axiális irányú erőkifejtéssel hoznánk létre benyomódást. A vizsgált sejt károsodása is elkerülhető, mivel a csapdázó nyaláb tőle több mikrométerre halad el. A szerkezetekkel kifejtett erőt azok pozíciója alapján határozzuk meg, aminek mérése a laterális irányú mozgatás esetén szintén precízebb, mint az axiális mozgatáskor. Végül, a szerkezetek sejttel érintkező részének a görbületi sugara kisebb, mint a csapdázott mikrogolyóké, ezért az azokéhoz hasonló benyomódás értékekhez kisebb erőket elegendő alkalmazni.

A méréseinket a szervezetben az agyi mikrokapillárisok falát alkotó, hCMEC/D3 endotél sejtek tenyészetén végeztük. A sejteknek alátámasztást nyújtó kb. 50 μm magas függőleges falakat SU-8 fotopolimerből készítettük fedőlemezre, maszk litográfiával. A sterilizált falakat először normál sejttenyésztő médiumba merítettük, majd a sejteket hozzáadva pár nap alatt egy folytonos sejtréteget hoztunk rajtuk létre. A polimer mikroszerkezeteknek (53. ábra A) két fő részük volt: az egyiket négy összekötött gömb alkotta (egy 14 μm oldalhosszúságú négyzet csúcsaiban), amelynél fogva a csipesz megragadhatja őket. A sejttel kölcsönható részük egy 2-3 mikrométer hosszú hegy volt, melynek a polimerizáló voxel alakjából adódóan laterális irányban kb. 100 nm, axiális irányban pedig kb. 500 nm a görbületi sugara, amely az irodalomban erre a célra használt mikrogyöngyökénél kisebb, de az AFM tűk hegyének sugaránál nagyobb.



54. ábra. Csapdapozíciók az endotél sejt Young-modulusának számolásához. A: A sejtes kísérletek egy jellemző csapdapozíció görbéje (zöld), és a referencia mérések átlagos csapdapozíció görbéje (piros) a benyomódásnak és a szerkezet csapdapozícióból való kimozdulásának meghatározását mutató szakaszokkal, A kék szaggatott vonal a 2.4 μm előtti szakaszokra illesztett egyenes. B: Egy kiválasztott referencia mérés során a szerkezet csúcsának a mozgás irányába (kék) és oldalirányba (piros) történő elmozdulása (a kis képen maga a szerkezet látható).

A rugalmasság kvantitatív meghatározásához az irodalomban legelterjedtebb Hertz modellt használtuk ((14) egyenlet, ahol ν a 0.5 értékűnek választott Poisson állandó), ami kapcsolatot teremt a benyomódáshoz szükséges F erő, a benyomódás mértéke (d_z), a benyomódást előidéző felület görbületi sugara (R_b) valamint a Young-modulus (E) között. Ez utóbbi meghatározásához tehát nekünk az előző három mennyiséget kellett megmérnünk.

$$F(d_z) = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R_b^{1/2} d_z^{3/2} \tag{14}$$

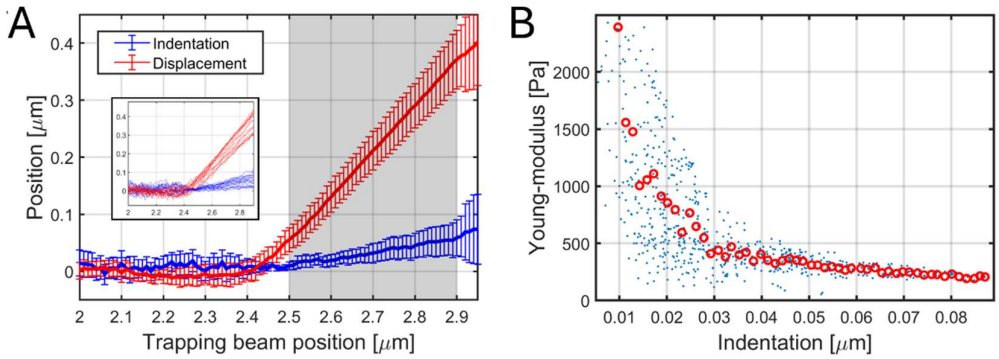
A mérés során a csapdázott szerkezeteket egy kiválasztott sejt felé fordítottuk, közel mozgattuk hozzá (53. ábra D), majd 10 nm-es lépéseben közelítettük a sejthez (53. ábra C) úgy,

hogy az átlagsebesség kb. 0.05 μm/s volt. Az ezközről minden egyes lépés után egy felvétel készült, aminek segítségével meghatároztuk az optikai csipeszhez képest a pozícióját. Amíg a szerkezet nem érintkezik a sejttel, annak pozíciója pontosan követi a csipeszét. A sejttel való kontaktus után még kb. 1 μm-t mozgattuk a csipeszt, ám ekkor a szerkezet már lemarad a csipeszhez képest, vagyis kimozdul az egyensúlyi helyzetéből (54. ábra A, letörés 2.4 μm után). Ebben a szakaszban a szerkezet F erővel nyomja a sejtmembránt, amely egyenlő a csapda által a szerkezetre kifejtett optikai erővel. Ez utóbbit pedig az $F = -k \cdot \Delta x$ képlettel számoltuk ki a mozgás irányában mért Δx kimozdulás mértékéből (54. ábra A) és a szerkezet k csapdaállandójából (k = 16.5 pN/μm, külön méréssel meghatározva). Az így megvalósított benyomódás mértékének meghatározásához kontrol kísérleteket végeztünk, ahol sejttel be nem vont falakhoz nyomtuk a szerkezetet. A benyomódás a sejtes és a sejt nélküli esetek közötti különbségből adódott (54. ábra A). A benyomó felület görbületét a szerkezet hegye görbületi sugarainak átlagaként 300 nm-nek vettük. Az egyes mérések szerkezet pozíció vs. csipeszpozíció függéseit az utóbbi tengely mentén egymáshoz igazítottuk, hogy a sejttel való kontaktus kezdetét jelentő letörések azonos pozícióba kerüljenek (53. ábra E). A csupasz falon történt méréseket ezután összeátlagoltuk, de a sejtes méréseket nem, hogy figyelembe vehessük a sejtek különbözőségét a Young-modulus számolásánál.

Az erő meghatározásához szükséges kitérést a szabadon mozgó állapot szakaszához illesztett egyenes (54. ábra A, kék szaggatott vonal) és a sejteken mért görbék különbsége szolgáltatta. A szerkezettel a sejteket kb. 50 nm-ig tudtuk anélkül benyomni, hogy annak hegye oldalra el ne csúszott volna, az elcsúszás utáni szakasz már kiértékelhetetlen volt (54. ábra B, kék görbe vége). Ez a kiértékelhető szakasz kb. 400 nm hosszú volt a csapdapozíció skáláján (55. ábra A, szürkített sáv), és a szakasz végén a legnagyobb benyomódáshoz kb. 5 pN erőre volt szükség. A különböző sejteken gyűjtött minden egyes benyomódás értékhez meghatároztuk a hozzá tartozó nyomóerőt, így minden egyes benyomódás adatponthoz tudtunk egy-egy Young-modulus értéket számolni (55. ábra B).

A fenti módszerrel meghatározott Young-modulus értékek az endotél sejtek esetében 220 Pa és 2500 Pa között voltak. Alapvetően két tendencia volt megfigyelhető a mért értékeken. Először az, hogy a nagyon kis benyomódásoknál (0.01 μm - 0.02 μm) az értékek szórása jelentős, ami a nagyobb benyomódások felé csökken, az értékek számosságával együtt (55. ábra B, kék pontok). A szórást úgy kezeltük, hogy a 0-90 nm benyomódás tartományt felosztottuk 60 egyenlő hosszú szakaszra, és mindegyik szakaszon kiszámoltuk az abba eső

Young-modulus értékek átlagát. A második megfigyelés, hogy az így kapott átlagok monoton csökkennek a nagy benyomódás felé. A kezdeti nagyobb szórás a szerkezet fluktuációjára vezethető vissza, ami összemérhető a kis benyomódásokkal, ám nagyobb csapdaerővel a későbbiekben csökkenthető. A nagy szórás miatt a tipikusan a 0.02 μm feletti benyomódásokhoz tartozó, 1000 Pa-nál kisebb Young-modulus értékeket tekintettük megbízhatónak. Az irodalomban hasonló értékeket közöltek borjú endotél sejteken (700-2700 Pa [186]), tüdő endotél sejteken (400-1500 Pa [187] AFM technikával) vagy mágneses csipesszel emberi köldökzsinór endotéleken (400 Pa [193]). A hasonló endotél sejtekre AFM-mel meghatározott Young-modulus értékek között az irodalomban nagyságrendnyi különbségek is lehetnek a mérési paraméterektől függően. Tekintsük át a leginkább meghatározó három paraméter, a benyomódás mértéke, annak sebessége, valamint a benyomódást előidéző felület alakja hatásait.



55. ábra. A szerkezet pozíciói és a belőlük kiszámolt Young-modulus. A: A szerkezettel elért benyomódás értékek (kék) és a szerkezetnek az egyensúlyi helyzettől való eltérése (piros) a csapdapozíció függvényében. A kis képen az egyes, egymáshoz igazított mérési görbék láthatók. B: A Young-modulus értékei az összes mérés összes csapdapozíciójában kiszámolva az abban a helyzetben meghatározott benyomódás függvényében (kék pontok, kb. 800 adatpont). A piros körök a kék pontok átlagát jelölik, melyeket a benyomódás tengely 0-90 nm tartományának 60 egyenlő hosszúra felosztott szakaszán számoltunk ki.

Az irodalomban nagyobb benyomódás értékéneknél kisebb Young-modulus értékek találhatók [188, 194] hasonlóan ahhoz, ahogy azt saját eredményeink is mutatják (55. ábra B). Az általunk alkalmazott maximum 90 nm-es benyomódással nagy valószínűséggel csak a sejtmembránt deformáljuk, a membrán alatt lévő citoszkeletális aktin hálózatot gyakorlatilag nem. A benyomódás sebességére 100 pN/s-től a 100 nN/s tartományig találunk értékeket, ennek növelése pedig növeli a mért Young-modulust, elsősorban viszkózus hatások révén [194]. A mi kísérleteinkben ez a szám tipikusan 1 pN/s volt (a benyomódás során ~0.01 μm/s mozgatási sebesség), ahol már biztosan kizárható a viszkózus ellenállás Young-modulust

látszólagosan növelő hatása. A benyomódást előidéző felület görbületének hatását is vizsgálták mások AFM tűk segítségével [188, 195, 196], ahol nagyobb görbületi sugarú tűvel kisebb Young-modulust lehet mérni ugyanazon a sejten. Az általunk használt 300 nm-es átlagos görbületűnek tekintett felület ezen a skálán magas értéknek számít, tehát az alacsonyabb Young-modulus értékek mérését valószínűsíti. Mindhárom trend azt mutatja tehát, hogy a mérési paramétereinkkel a más módszerekkel meghatározott értékek alacsonyabb tartományaiban mérjük várhatóan a Young-modulus értékét. Összegzésként elmondhatjuk, hogy módszerünk a mások által hasonló sejteken mértekhez hasonló Young-modulus értékeket eredményezett, és hogy a szerkezetünk által biztosított kis benyomódás és kis sebesség, valamint a nagy görbületi sugarú felület alkalmas a kitapadó sejtek viszkózus hatásoktól mentes, tisztán elasztikus jellemzőinek meghatározására.

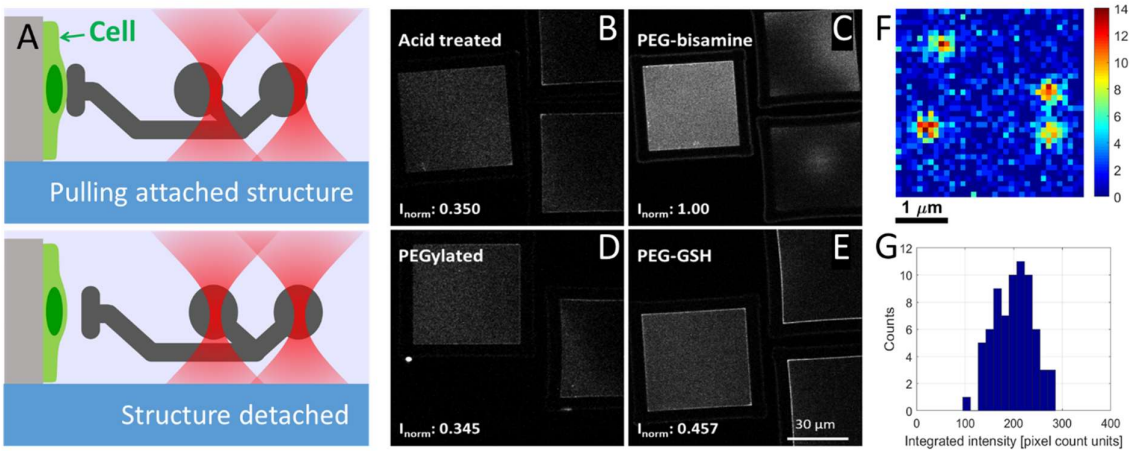
7.3. Nanorészecske bejuttatást segítő molekulák endotél sejtekhez tapadása

A polimer mikroeszközökkel végezhető erőmérést egyedi sejtekkel kapcsolatos, molekuláris szintű kölcsönhatások jellemzésére is lehet használni. Egy gyógyszer hatóanyag bejuttatás javítását célzó projekt keretében vizsgáltuk a szerkezetekkel az endotél sejtek felszínéhez való tapadás erősségét.

A gyógyszer hatóanyagok célba juttatásának erőteljesen kutatott területe a lipid nanorészecskék (Lipid NanoParticles, LNP) alkalmazása erre a célra. A szorosan egymáshoz kapcsolódó endotél sejtek alkotta vér-agy-gát (Blood Brain Barrier, BBB) az agy egyik hatékony védekező rendszere, amely szabályozza, hogy az agyi kapillárisokból mely molekulák juthatnak be az idegsejtek közötti térbe. Ha egy, a BBB által egyébként át nem engedett hatóanyagot LNP-be csomagolunk, azt az endotél sejtek pl. a saját membránjuk és az LNP fúziója vagy endocitózis révén fel tudják venni, és továbbszállítani az idegsejtek közötti térbe. A folyamat hatékonysága növelhető, ha a LNP-k felszínét valamely, a sejtmembránon lévő receptor ligandumával vonják be (célzott bejuttatás, „targetálás”).

A mi motivációnk az volt, hogy jellemezzük egy ilyen targetáló molekula endotél sejthez való tapadását a tapadás valószínűségével és erejével [197]. A munkát a Dr. Deli Mária vezette Biológiai Barrierek Kutatócsoporttal közösen végeztük. Ez a csoport korábban megállapította, hogy a glutation nevű tripeptid (GSH), amelynek van receptora az endotél sejtek felszínén, hatékony targetáló molekula, mivel az ezzel bevont LNP-ket a sejtek több, mint másfélszer nagyobb valószínűséggel veszik fel, mint a be nem vont LNP-ket [198]. A folyamat megértése

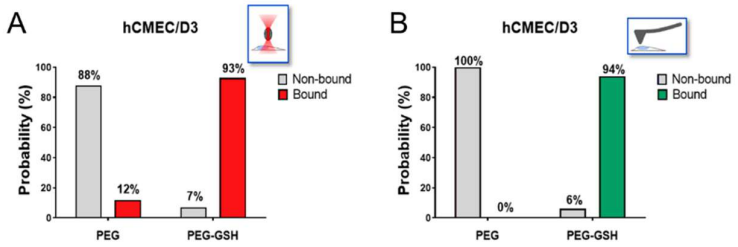
szempontjából fontos a GSH-val bevont LNP sejthez való tapadásának, mint a hatóanyag átadás első lépésének jellemzése.



56. ábra. Tapadási erő mérése funkcionalizált mikroeszközzel és a funkcionalizálás ellenőrzése. A: Az erőmérés sematikus ábrája. A felső képen a falra növesztett sejthez nyomott mikroeszköz látható az elhúzás közben. A piros terület a csapdázó nyalábokat mutatja. Az alsó képen az elszakadás után a csapdázó nyalábok újra a csapdázó gömbök közepén haladnak át. B-E: Konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételek egy csak savval kezelt (B), egy PEG-diaminnal kezelt (C), egy PEG-maleimiddel kezelt (D) és egy PEG-melaimied + GSH-val kezelt (E), majd CY5-NHS-észterrel megfestett SU-8 felületről. A képek bal alsó sarkában látható I_{norm} értékek a felületek átlagos fluoreszcencia intenzitásait jelölik a C képen szereplő felülethez normalizálva. F: Üveg felületre tapadt egyedi CY5-NHS-észter molekulák képei, ahol a színskála az egyes pixelekre jutott beütésszámot jelöli. G: Az egyes CY5-NHS-észter molekulák képei integrált fluoreszcencia intenzitásának hisztogramja. A leggyakoribb integrált intenzitás a 210 beütésszám volt.

Az optikai mikromanipuláció az általa elérhető erőtartomány alapján alkalmasnak tűnt a folyamat vizsgálatára. Mivel a LNP-ket azonban nem tudjuk közvetlenül csapdázni és a sejthez nyomni, ezért kétfotonos polimerizációval mikroeszközöket készítettünk és ezeket vontuk be glutationnal, majd érintettük optikai csipesszel a sejtek felszínéhez (56. ábra A). A tapadás valószínűségének méréséhez egyszerű ellipszist használtunk, az erőmérésre pedig a Young-modulus mérésnél bemutatotthoz hasonló mikroeszközt. Az SU-8 fotopolimerből készült szerkezetek glutationnal való bevonásához ezúttal is egy PEG-amin származékot használtunk, ahol a PEG lánc az egyik végén lévő amin csoporttal köt a felülethez a másikon pedig egy maleimid csoport köti meg a GSH-t. A GSH-val való bevonást fluoreszcens mikroszkópiával, amin-reaktív festékkel (CY-5-NHS-észter) igazoltuk, ami a tripeptid aminocsoportjához köt. A kísérletekben hCMEC/D3 sejttenyészetből származó endotél sejtet használtunk.

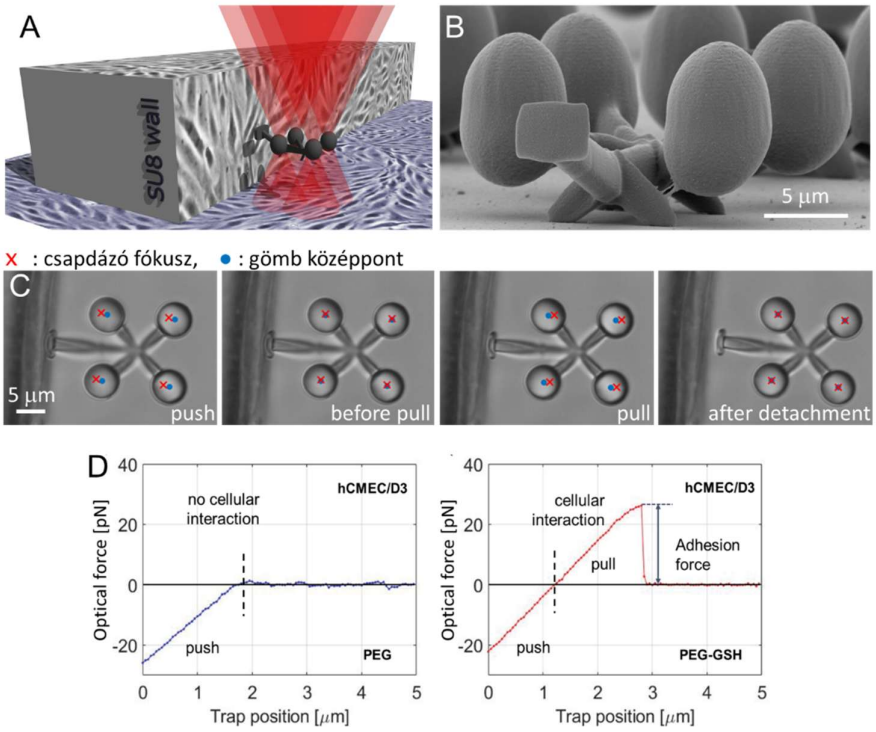
Elsődlegesen azt igazoltuk, hogy a glutation valóban megtapad az SU-8 szerkezetek felületén. Fluoreszcens mikroszkóppal készítettünk felvételeket SU-8 felületekről melyeket a glutationos bevonás egyes lépései után CY5 festékkel festettünk meg (56. ábra B-E). Pozitív kontrol egy PEG-diaminnal bevont SU-8 felszín volt, amihez a CY5 festék biztosan hozzá tud kötni. A felvételek azt mutatták, hogy a GSH-val borított felületen kb. 1.3-szor több festékmolekula van, mint a csak savval vagy csak PEG-maleimiddel kezelteken, ami igazolja, hogy a glutation valóban kikötődött a felületre. Egyetlen CY5 festék molekula fluoreszcencia integrált intenzitását 200.2 ± 39.7 értékűnek mértük (56. ábra F, G), ebből, és a GSH-val bevont és megfestett rétegeken mért fluoreszcencia intenzitásból pedig kiszámoltuk, hogy a felületeket a CY5 festék 2500 ± 770 CY5/μm^2 sűrűséggel borítja be, ami a targetáló molekula felületi sűrűségére ad egy alsó becslést.



57. ábra. GSH-val funkcionalizált felületek endotél sejtekhez tapadásának valószínűsége. A: GSH-val bevont (PEG-GSH) és nem bevont (PEG) ellipszoidok tapadási valószínűsége sejttenyészetben növesztett sejtekhez. B: GSH-val bevont (PEG-GSH) és nem bevont (PEG) AFM tű tapadási valószínűsége sejttenyészetben növesztett sejtekhez. Bond: történt tapadás, Non-bond: nem történt tapadás.

A sejthez való tapadás valószínűségét GSH-val bevont, csapdázott ellipszoidokkal és atomerő mikroszkóppal vizsgáltuk (57. ábra). A csapdázott ellipszoidokat először az üveg hordozóra konfluensen nőtt sejtekhez érintettük felülről, majd 10 s várakozás után megpróbáltuk elszakítani a sejttől. A sejthez tapadás valószínűségére azt a mérőszámot adtuk, ami az el nem távolítható ellipszoidoknak az összes kísérlethez való százalékos aránya volt. A várakozásoknak megfelelően a tapadás a hCMEC/D3 sejtekre 93% valószínűségű volt a GSH-val bevont ellipszoidokra, glutation nélkül pedig csak 12%. Az AFM méréseket nanométeres görbületi sugarú tűvel végeztük, és azt tapasztaltuk, hogy a GSH-val bevont tű az esetek 94 százalékában hozzátapadt a tenyésztett D3 sejtekhez, a glutation nélküli tű pedig nem. Vagyis

a glutationnal borított felületek valóban jelentősen nagyobb valószínűséggel tapadnak a sejtmembránhoz.

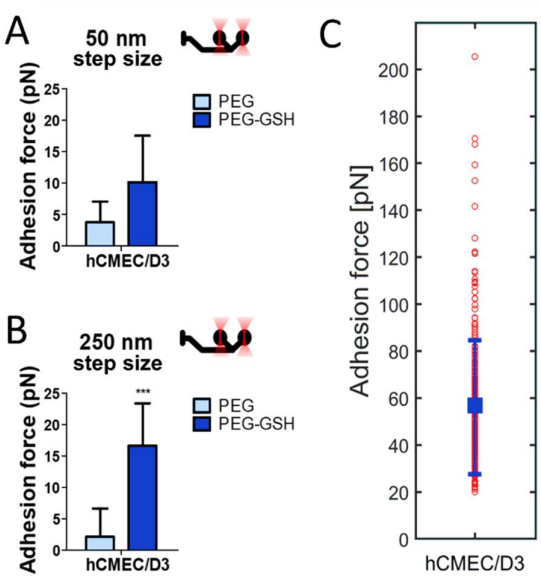


58. ábra. A tapadási erő mérési elrendezése és a kapott erőgörbék magyarázata. A: A mérési elrendezés vázlatos képe. A sejteket az üveg hordozón és a fotopolimer falon egy összefüggő monorétegbe növesztettük, majd az optikai csipesszel mozgatott mikroeszközt a falon lévő sejtekhez nyomtuk. B: A mikroeszköz pásztázó elektronmikroszkópos képe. C: Egy mérés optikai mikroszkópos felvételei. A szerkezetet nekinyomtuk a sejtnek, majd elhúztuk, végül a köztük lévő tapadás megszűnt. A legfontosabb információ a csapdapozíció és a csapdázó gömb közepének relatív helyzete. D: A C ábrán ábrázolt folyamat közben mérhető erő értékek. A bal oldalon egy olyan eset látható, ahol a szerkezet nem tapadt a sejthez, a jobb oldalon pedig olyan, ahol igen. Az erő értékeket a csipesz és a csapdázó golyó relatív helyzetéből és a csapdaállandóból számoltuk ki. Tapadás esetében mind a sejt felé mutató (push), mind az attól ellenkező irányba mutató (pull) erő mérhető.

A GSH-val borított felület sejthez tapadási erejének méréséhez a korábban a sejtmechanikai vizsgálatoknál használt elrendezést alkalmaztuk (53. ábra B). A D3 sejteket 50 µm magas, függőleges SU-8 falak oldalaira növesztettük, hogy a sejtmembránt a csipesszel mozgatott szerkezetek laterális mozgatással meg tudják közelíteni. A 4 db csapdázó gömb mellett a szerkezet fő funkcionális eleme egy lapos, kb. 15 µm^2 területű enyhén domború felület, amelyet a sejtekhez nyomtunk (58. ábra B). A szerkezetek csapdaállandóját külön mérésekben kalibráltuk, ami átlagosan 25.8 pN/µm-nek adódott.

A glutationnal bevont felület tapadási erősségének mérése a D3 sejthez tapadt szerkezet elhúzása közben bekövetkező elszakításhoz szükséges optikai erő mérésén alapult (58. ábra C).

A szerkezetet először az optikai csipesszel a sejthez nyomtuk kb. 10-30 pN erővel, majd 10 s várakozási idő után a csapdapozíció 50 nm-es vagy 250 nm-es lépésekkel történő mozgatásával elhúztuk tőle. Ha nem történt tapadás (58. ábra D), a szerkezet az elhúzás során pontosan követte a csapda pozícióját. Tapadás esetén azonban sokáig nem mozdult a szerkezet, miközben a csapda egyre nagyobb, a sejttel ellentétes irányba mutató húzóerőt fejtett ki rá (58. ábra E). Egy adott erőnél aztán a szerkezet elszakadt a sejttől, felvette a csapda pozícióját, és azt követte tovább. Ezt az elszakadáskor megfigyelt optikai erőt tekintettük a sejthez tapadás erejének. Az optikai csipeszes értékeket AFM mérésekkel vetettük össze. Az AFM mérésekhez olyan konzolt használtunk, ami a polimer mikroszerkezetekével összemérhető tapadási felületet biztosít. Ezeknek a konzoloknak a végén egy kb. 5 µm átmérőjű gömb volt, amelyet bevontuk glutationnal. Fontos körülmény, hogy az AFM készülék a használt konzollal 10 pN alatt nem mér megbízhatóan.



59. ábra. GSH-val bevont felületek endotél sejthez tapadásának ereje. A-B: GSH-val bevont (PEG-GSH) és nem bevont (PEG) szerkezetek D3 sejtekhez való tapadásának ereje 50 nm-es (A) és 250 nm-es (B) lépésekkel végrehajtott elhúzás esetében. C: GSH-val bevont AFM lapkára erősített gömb D3 sejtekhez való tapadásának ereje

Méréseink azt mutatták, hogy a glutationnal bevont polimer mikroszerkezetek endotél sejthez való tapadásának erőssége szignifikánsan, az 50 nm-es lépésekre 3-szor, a 250 nm-esekre pedig 8-szor nagyobb volt, mint a bevonat nélkülieké (59. ábra A, B). Az AFM-es ellenőrző kísérletekkel az átlagos tapadási erő 60 pN volt (59. ábra C). A magasabb erő értékeknek a 10 pN érzékenységi határ mellett az is oka lehetett, hogy az AFM konzol gömbjét jóval nagyobb, 100 pN erővel nyomtuk a sejtekhez, ami több molekuláris kapcsolat

létrejöttéhez vezethet. Az ebben a munkában kapott eredményeinknek az ad különös jelentőséget, hogy ezek az irodalomban az első erőértékek, amit élő sejt és glutation között bármilyen módon megvalósított tapadás erősségeként mértek.

7.4. Összegzés

1. Rákos sejtek szűk fizikai akadályokon való átjutásának vizsgálatát lehetővé tevő, szubmikrométeres szélességű nyílásokkal rendelkező gátrendszert, mint az áttétképződés egy modelljét készítettem el mikrofluidikai rendszerben. A gát struktúrát közvetlenül a mikrofluidikai rendszerben polimerizáltam, ami ott két folyadékrészt választott el, melyek csak a gát nyílásain keresztül voltak összeköttetésben. 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.
2. Egyedi sejtek mechanikai vizsgálatára alkalmas, optikai csipesszel mozgatható polimer mikroeszközt készítettem és alkalmaztam. Az eszközzel egy újszerű elrendezés szerint mértem meg endotél sejtek membránjának Young-modulusát, amelyben a sejteket függőleges mikroméretű falakra növesztettem, az eszközt pedig az optikai tengelyhez képest merőlegesen mozgatva váltottam ki benyomódásokat a sejtek membránján. A kapott eredmények megbízhatóságát az irodalomban található rugalmasság értékekkel és kísérleti paraméterektől való függésekkel történő jó egyezés mutatja. A módszer az atomerő mikroszkóppal elérhető kísérleti paramétertartományt terjesztheti ki, mivel az AFM-énál kisebb nyomóerőkkel és benyomódási sebességekkel is képes mérni.
3. Elsőként vizsgáltam a gyógyszerbejuttatásra alkalmas nanorészecskék hatékonyságát növelő anyagnak, a glutationnak endotél sejtekhez való tapadását optikai csipesszel mozgatott, funkcionalizált mikroeszközökkel. A tapadás valószínűségét endotél sejteken vizsgálva azt találtam, hogy a szerkezetek szinte kizárólag csak akkor tapadtak hozzájuk, amikor glutation is volt a felszínükön. A polimer mikroeszközt a sejtekhez tapasztva, majd optikai csipesszel 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 jó egyezést adott.

Releváns publikációk

Sima F. et al. ACS APPL. BIO MAT. 1:1667-1676. (2018)
Grexa I. et al. MICROMACHINES 11:882. (2020)
Fekete T. et al. ACS APPL. MATER. INTERF. 13:39018-39029. (2021)

8. Mikroszerkezetek alkalmazása egyedi sejtek mikroszkópos megfigyelésében

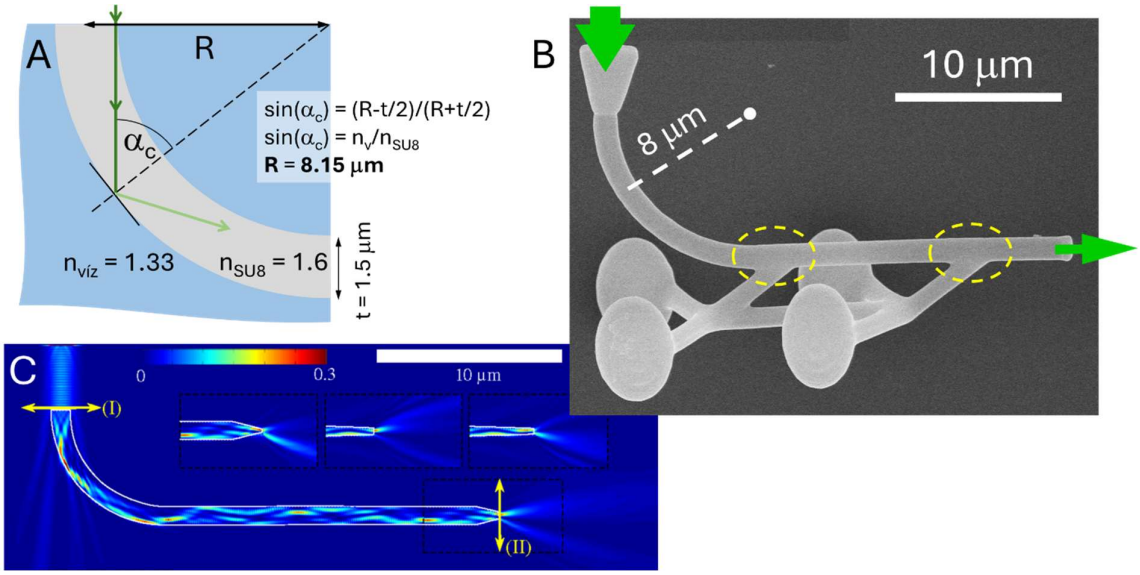
Az egyedi sejtek mikroszkópos vizsgálata mindig is a biológia egyik legfontosabb eljárása volt. Ennek köszönhetően a mikroszkópiával kapcsolatos módszerek is folyamatosan fejlődnek a már meglévő eszközök fejlesztése vagy újak bevezetése által. A sejtek vizsgálatára használható mikroeszközöket méretük miatt elsősorban mikroszkópos rendszerekben alkalmazzák. Ilyen mikroeszközöket az előző évtizedtől fogva egyre több célra fejlesztenek [44, 107, 120, 181, 184, 185, 199, 200]. Ebben a fejezetben az optikai csipesszel mozgatható, egyedi sejtek mikroszkópos vizsgálatára használható eszközök fejlesztése és alkalmazás terén elért eredményeimet mutatom be.

8.1. Egyedi sejtek többirányú, lokális fluoreszcens gerjesztése

Egyedi sejtek fluoreszcenciás mikroszkópiájában alkalmazható lokális gerjesztés egy lehetséges megvalósítási módját vizsgáltuk egy kooperációs projektben [201]. Egy olyan mikroeszközt fejlesztettünk dán együttműködő partnereinkkel, amellyel a fluoreszcens gerjesztő fénnyel a mikroszkóp rendszer optikai tengelyére merőleges irányból lehet megvilágítani a sejtet. A lokalizált gerjesztés elérése pl. fényérzékeny sejt vagy fluorofór használata esetén kívánatos. Az eszköz egy, a mintatérben szinte tetszőlegesen pozícionálható, kb. 20 μm hosszú egymódusú fényvezető szál, melyet optikai csipesszel lehet mozgatni. Ebben a rendszerben a fényvezető magja a nagy törésmutatójú SU-8 fotopolimer (n=1.6), a köpeny pedig a kisebb törésmutatójú víz (n=1.33). A fényvezető szálat úgy hoztuk létre, hogy 90 fokkal eltérítse a belé csatolt fény irányát, így érve el az optikai tengelyre merőleges irányú gerjesztést.

A szegedi laboratóriumban a mikroeszköz tervezését, készítését és alakjának optimalizálását végeztem el. Az eszköz két részből állt (60. ábra B): az első maga a fényvezető, amelyet a másik részre, egy csapdázó gömbökből és összekötő rudakból álló alapzatra rögzítettünk. A fényvezető egy negyed körívben polimerizált szálból és az ezt követő egyenes szálból állt. A fény becsatolásának megkönnyítéséhez az ív elejére egy szélesebb fényvezető szakaszt polimerizáltunk. A nagyobb becsatoló és a kisebb kicsatoló felület révén a gerjesztő intenzitás elvben növelhető is. A mobil eszköz alakja optimalizálásának szempontjai a következők voltak:

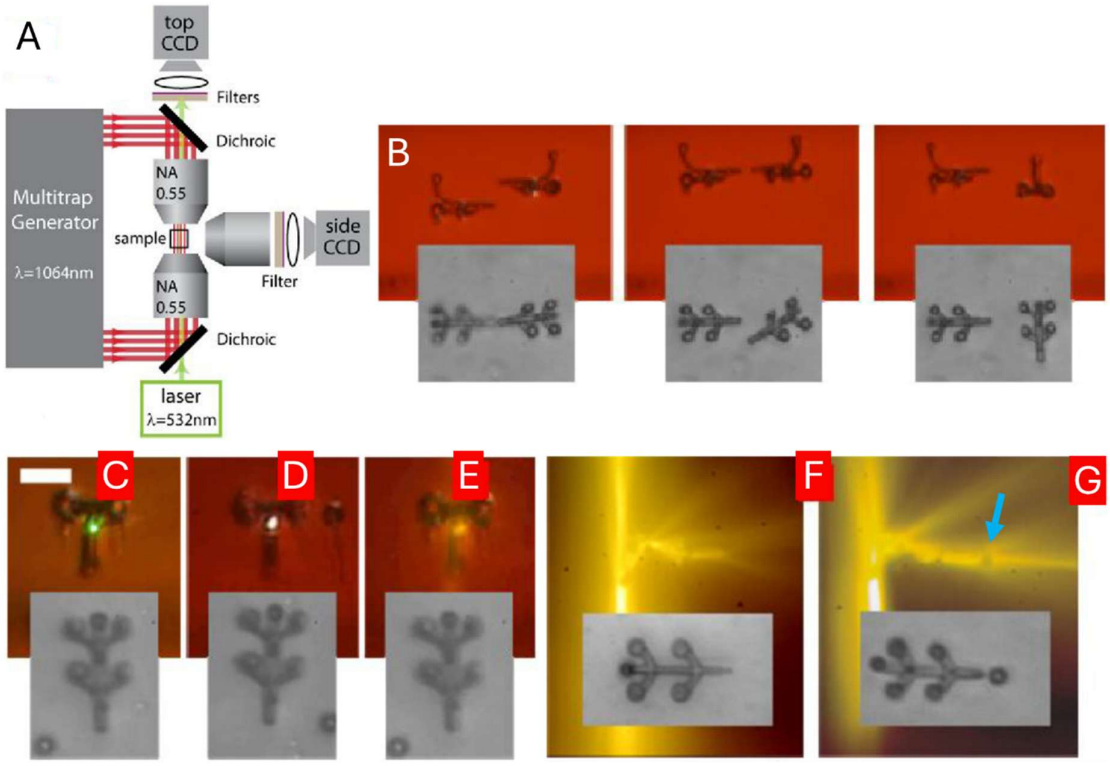
A fényvezető szál vastagságát a lehető legkisebbre választottuk, hogy egyetlen módus terjedjen benne, azonban még reprodukálhatóan legyen polimerizálható. A szál vastagsága így 1.5 µm lett. A nyaláb 90 fokos eltérítését létrehozó ív görbületi sugaránál a cél a minimális kiszóródó fény volt. A veszteséget a fényvezető és a környezet anyagának a fény hullámhosszán mérhető törésmutatójának a különbsége határozza meg (n=1.6, illetve 1.33). Ebben a rendszerben a határszög, ahol még teljesül a teljes visszaverődés $\alpha = \arcsin(n_{víz}/n_{su-8}) = 56.2^o$. Egy egyszerű becsléssel (60. ábra A) meghatároztuk, hogy egy 1.5 µm vastag SU-8 szál alkotta ív esetében az az R görbületi sugár, ahol a legbelső nyaláb, ami a legnagyobb beesési szöget látja, még éppen a határszög értékével érkezik meg az ív külső felületére, R~8.2 µm-nek adódik, így az ívet 8 µm-es sugárral polimerizáltuk.



60. ábra. Mobil fényvezető szál tervezése. A: A fényvezető szál íves része görbületi sugarának becslése a teljes visszaverődés eléréséhez. A sötétzöld nyíl azt a nyalábot jelzi, ami a visszaverő külső felülethez a legkisebb beesési szöggel érkezik. B: A mobil fényvezető elektronmikroszkópos képe. A zöld nyilak a be- és kilépő fényt jelzik. C: A fényvezető szál FDTD szimulációjának eredménye (λ=532 nm). A kis képeken a kilépő szálvég néhány vizsgált geometriája látható.

Kooperációs partnereink időtartománybeli véges differencia módszer számolással (finite-difference time-domain, FDTD, 60. ábra C) azt találták, hogy a fényterjedés még egy 6 µm görbületi sugarú ív esetében is elenyésző veszteséggel történik. A szál azon végére, ahol a fényt becsatoljuk, egy 3.5 µm-re kiszélesedő, kb. 4 µm hosszú „tölcsért” polimerizáltunk a becsatolási veszteség csökkentésére. Kezdeti megfigyeléseink szerint, amikor szál kilépő végét hegyesre polimerizáltuk, a fény nagy numerikus apertúrával lépett ki. Ezért a végső változatban egy végig állandó vastagságú szálat készítettünk. Az FDTD számolásokban egyébként a kilépő fény az összes szálvég kialakítás esetében inhomogén intenzitáseloszlást mutatott. A

fényvezetőt tartó váz elrendezésénél a stabil pozícionálhatóság mellett kellett a fényveszteséget minimalizálni. Egy „alvázat” készítettünk a szerkezetnek, ami a négy csapdázó gömböt fogja össze, és ehhez csatlakoztattuk a fényvezető szálat két rúddal. A tartórudak a szórás és a kicsatolás minimalizálása miatt 135 fokos szöggel csatlakoznak a szálhoz (60. ábra B, sárgával bekarikázott rész).



61. ábra. A mobil fényvezető szálak mozgatása és szálba történő becsatolás. A: A fényvezető szálak mozgatásához, a becsatoláshoz és megfigyelésükhöz használt optikai rendszer a kooperációs partnerünknél. B: Két egyidejűleg mozgatott mobil szálnak a csapdázó rendszerben történt megfigyelése oldalnézetben (vörös háttér) és felülnézetben (szürke háttér). A baloldali struktúrát mindhárom képen csak az optikai tengely irányába mozgatták, míg a jobboldalit ezen kívül az optikai tengely körül el is forgatták. C-D: A becsatolt, és a szálak kilépő felületén megjelenő fény 532 nm-en (C) illetve 1064 nm-en (D), oldalnézetben (vörös háttér) illetve a szerkezetek felülnézetben (szürke háttér). E: A szál kilépő felületén látható fluoreszcens gerjesztés oldalnézetben (vörös háttér). F: Emittált fény mintázat fluoreszcens oldatba merített mobil szálba csatolt fény gerjesztésével oldalnézetben (sárga háttér) és felülnézetben (szürke háttér). G: Ugyanaz az elrendezés, mint az F ábrán, csak a kilépő fénybe egy csapdázott mikrogolyót mozgattak (kék nyíl). Látható, hogy a kilépő fény a fluoreszcens oldatot keskenyebb sávban gerjeszti.

A szerkezeteket kooperáló partnerünk optikai csipesz rendszerével teszteltük (61. ábra A). Azt tapasztaltuk, hogy a szerkezet geometriája stabil csapdázást és mozgatást tesz lehetővé: a tér három irányába való transzláció a teljes mintatérben és két tengely menti rotáció reprodukálhatóan végrehajtható velük (61. ábra B). A szerkezet síkjának normálisa körüli 360

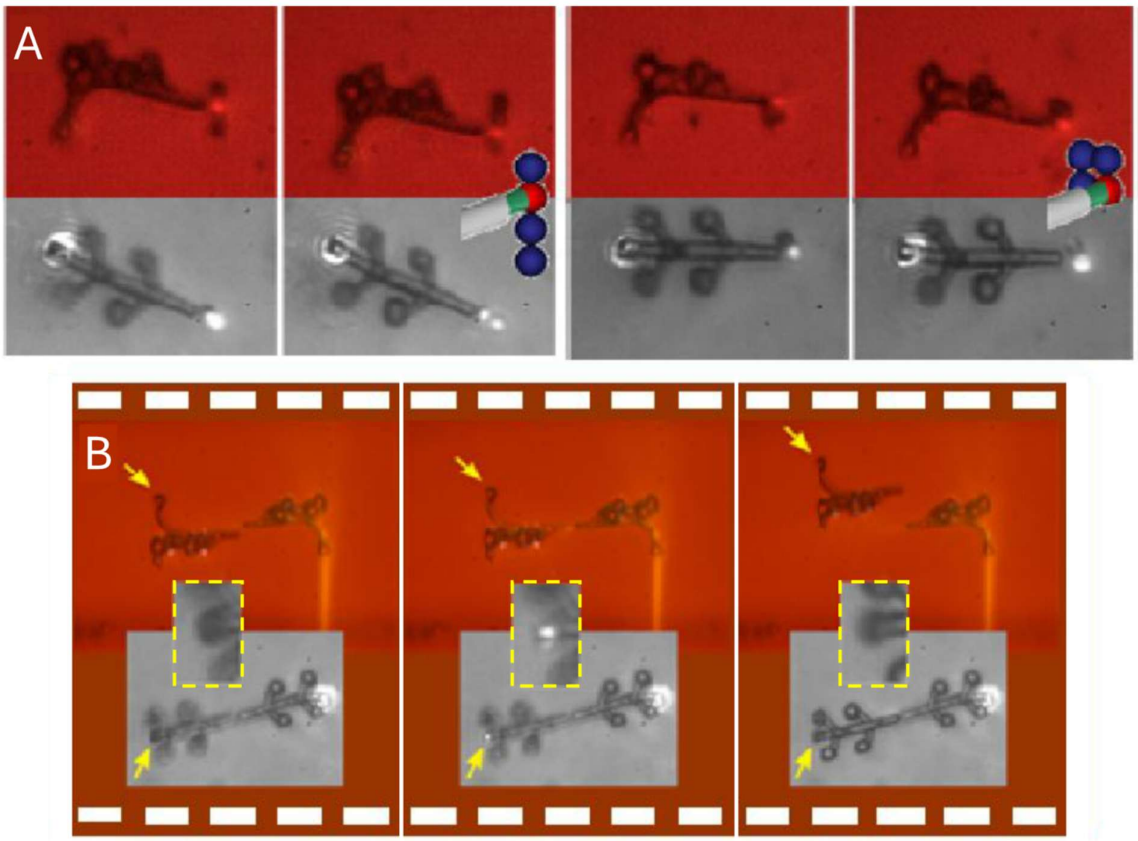
fokos körbeforgatás, valamint a hossztengelye körüli ±90 fokos forgatás során a csapda stabilan tartja azt. A fény szerkezetbe való becsatolása minden olyan pozícióban lehetséges volt, ahol a szerkezet síkja merőleges, vagyis a becsatoló „tölcsér” tengelye párhuzamos volt az optikai tengellyel. A becsatolást 532 nm-es és 1064 nm-es hullámhosszú fénnyel egyaránt demonstráltuk azáltal, hogy megfigyeltük a fényvezető szál kilépő felületén megjelenő fényt (61. ábra C, D).

A szálból kilépő fény intenzitáseloszlásának jellemzéséhez a szerkezeteket fluoreszcens oldatba helyeztük, és megfigyeltük a kilépő fénnyel megvilágított folyadékban az emittált fényt. A kilépő fény eloszlása kvalitatívan megegyezett a szimulációkban kapott eredménnyel, vagyis bár irányított volt, de meglehetősen inhomogén és gyorsan szélesedő (nagy NA) (61. ábra F). Alkalmas optikai elemmel azonban csökkenthető volt a fény divergenciája: az optikai csipesszel egy mikrogolyót a szál végéhez pozícionálva az lencseként összegyűjtötte a szálból kilépő fényt (61. ábra G). A nagy divergencia a szerkezet jelen formájában kissé korlátozza az alkalmazást (a szál végét a gerjeszteni kívánt tárgy közvetlen közelébe kell vinni), de az intenzitás eloszlás a kilépő felület alakjának előzetes szimulációkkal megtámogatott módosításával véleményem szerint optimalizálható. Csökkentendő továbbá a szál íves részénél és a szálat tartó rudaknál a fluoreszcens oldat segítségével megfigyelt fényveszteség.

A szerkezettel elérhető lokális gerjesztést két módszerrel is teszteltük. Elsőként optikai csipesszel, az optikai tengely irányában egy sorban, illetve négyzet alakban csapdázott, 3 μm átmérőjű fluoreszcens golyókat világítottunk meg vele. Ezeken az elrendezésekben ahhoz, hogy csak egyetlen kiválasztott golyót gerjesszünk, és hogy a golyók ne árnyékolják egymást, az szükséges, hogy a gerjesztő fényt az optikai tengely irányából 90 fokkal eltérítsük. Megmutattuk, hogy az így kivitelezett lokális gerjesztéssel csak az a golyó emittál fényt, amelynek a közelébe pozícionáltuk a fényvezető szál kilépő végét (62. ábra A). A második kísérlet során az egyik szerkezetet, amibe becsatoltuk a fényt, egy másikhoz közelítettük úgy, hogy az elsőből kilépő fény a második szerkezet kilépő felületét világította meg. Ekkor a második szerkezetbe annak kilépő felületén keresztül valóban bejutott a fény, majd végighaladva a szálon a kilépő fény megfigyelhető volt a szerkezet becsatoló felületén (62. ábra B).

Összefoglalva, ezzel a munkával egy olyan mikroeszköz prototípusát mutattunk be, amellyel lokális fluoreszcencia gerjesztés valósítható meg olyan minták esetében is, amelyek nem érhetők el a gerjesztő fény számára az optikai tengely irányából. Sikeresen demonstráltuk,

hogy meg lehet változtatni a fluoreszcens gerjesztő fény irányát akár 90 fokkal is, és mikrométeres területre fókuszálni egy estelegesen nagyobb átmérőjű nyalábot. A veszteségek minimalizálásával és a belépő és kilépő felületek alakjának intelligens tervezésével a bemutatott eszköz alapja lehet egy kisebb kilépő numerikus apertúrával és nagyobb intenzitást jellemezhető szerkezetnek is.



62. ábra. Lokális fluoreszcencia gerjesztés mobil fényvezető szállal. A: Optikai csipesszel egy sorban megfogott (bal oldali két kép) és négyzet alakban megfogott (jobb oldali két kép) fluoreszcens mikrogolyók lokális gerjesztése. Az oldalnézeti képeken (vörös háttér) jól látszik, hogy a szálból kilépő fény mindig csak egyetlen golyót gerjeszt. B: Egy mobil szálba (mindhárom képen a jobboldali szerkezet) becsatolt fénynek a vele szembefordított szálba való átcsatolása. Az oldalnézeti képek (vörös háttér) mutatják a két szál egymáshoz viszonyított helyzetét az optikai tengely mentén, míg a felülnézeti képen (szürke háttér) az látszik, hogy az átcsatolás csak a teljesen szembefordított helyzetben (középső képek) valósul meg. Ekkor a bal oldali szál becsatoló felszínén (sárga nyíl) megjelenik a becsatolt fény egy része (szaggatott sárgával keretezett kis kép).

8.2. Optikai mikroszkóp felbontásának javítása indirekt mikromanipulációval

Ahogy azt az 6.2 fejezetben bemutattam, az epoxi alapú polimer mikroszerkezetek funkcionalizálásával el lehet érni, hogy egyedi, nem letapadó sejtek a szerkezetekhez tapadjanak és így azokat optikai csipesszel indirekt módon mozgatni lehessen. Egyedi úszó

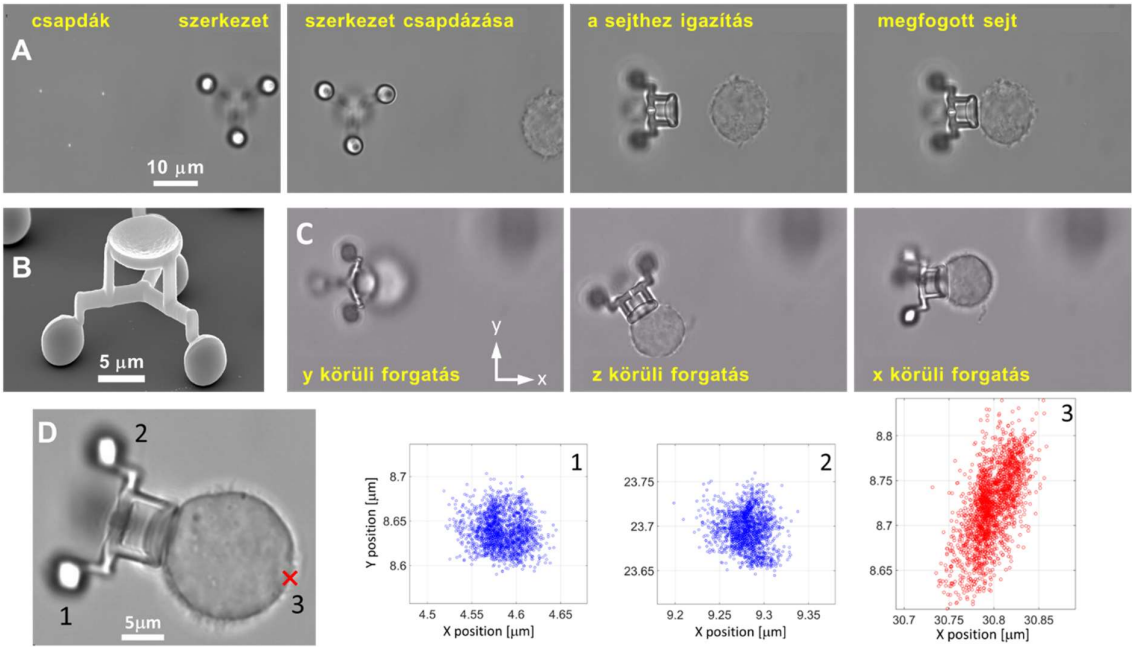
sejtek kontrollált, független mozgatása az optikai csipeszen kívül megvalósítható pl. lamináris áramlással [202] vagy dielektroforézissel is [203]. Ezekkel összehasonlítva, az optikai csipeszes mozgatás előnye, hogy a sejt a viszkózus ellenállás által megszabott limit alatt tetszőleges sebességgel (~100 μm/s) és irányokba transzlálható és forgatható, valamint, hogy a mozgatás bármely pozícióban megállítható. Fontos jellemző, hogy a sejtet a nagy elérhető csapdaerőnek köszönhetően igen kis fluktuációval, tetszőleges ideig lehet egy kiválasztott pozícióban tartani. A módszer legnagyobb hátránya az, hogy a sejtet valamilyen módon az eszközhöz kell tapasztani, és később nem lehet a kettőt szétválasztani. Ennek megoldására egyébként nemrégiben a 8.3 fejezetben bemutatott eljárást dolgoztuk ki. Ebben a fejezetben az indirekt sejtmanipulációnak az egyedi sejtek optikai mikroszkópos 3D képalkotásában való alkalmazását mutatom be.

8.2.1. Egyedi sejtek 6 szabadsági fokú mozgatása

A 6.2 fejezet végén röviden már említett mikroeszköz az egyik legegyszerűbb megoldása a sejt stabil, indirekt mozgatásának [130]. Az eszköz elektronmikroszkópos képén (63. ábra B) jól láthatók annak funkcionális részei. A csapdázást három, kb. 4 μm átmérőjű gömb teszi lehetővé, melyek egy egyenlő oldalú háromszög csúcsaiban helyezkednek el. A szerkezet tetején egy 7 μm átmérőjű és 15 μm görbületi sugarú gömbhéjat polimerizáltunk, amelyhez a sejt hozzá tud tapadni. A szerkezet méreteit – bizonyos keretek között – a sejtek méreteihez szabadon hozzá lehet igazítani. A gömböket és a tapadó felületet vékony merev rudak kötik kösze. A holografikus optikai csipesz három csapdázó fókuszfoltjával megragadva a gömböket, a szerkezetet és a hozzá tapasztott sejtet a térben tetszőlegesen lehet mozgatni. Ez lehetővé teszi, hogy a sejtről a mikroszkóppal gyakorlatilag tetszőleges irányból felvételeket készíthessünk. A 63. ábra A és C paneljei egy szerkezet csapdázását, sejthez való tapasztását, majd a sejt három tengely körüli forgatását mutatják be. Amikor a szerkezetet sztreptavidinnel vontuk be, a sejtet pedig biotináltuk (ld. a 6.2 fejezet), a stabil egymáshoz tapadásuk kb. 10 másodpercen belül megtörtént.

A sejtet a szerkezettel vizes közegben kb. 100 μm/s sebességgel lehetett transzlálni, az optikai (z) tengely körüli legnagyobb ellenállást jelentő forgatás esetében pedig 65 fok/s az elérhető szögsebesség. A mikroszkópos leképezéshez elengedhetetlen, hogy a sejt fluktuációja álló helyzetben összemérhető, de inkább kisebb legyen, mint az optikai felbontás. A fluktuáció a sejtnek azon a pontján a legnagyobb, amelyik a csapdázó pontoktól legtávolabb van. Ez, a 63. ábra D paneljén piros kereszttel jelölt pont a csapdapozíciók síkjától 25 μm-re volt. Ennek

a pontnak a fluktuációja a szerkezet tengelyével megegyező irányban kb. 50 nm volt, arra merőlegesen pedig kb. 120 nm (63. ábra D). A sejt tetszőleges mozgatása és az adott pozícióban, egy átlagos mikroszkóp felbontóképességével összemérhető fluktuációja alkalmassá teszi az indirekt sejtcsapdázást képalkotó eljárásokban történő használatra.



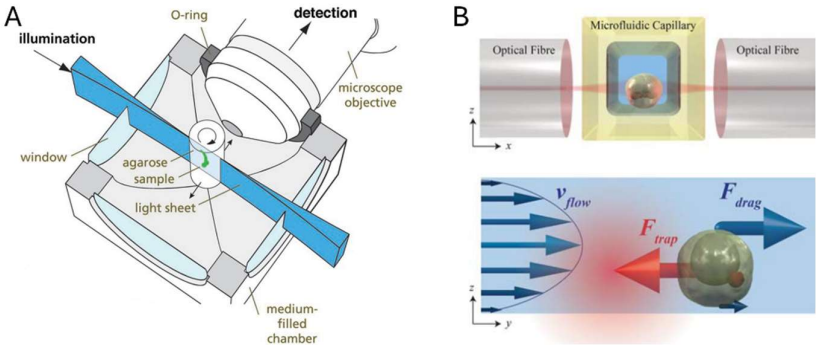
63. ábra. Hat szabadsági fokú indirekt optikai sejtmanipuláció. A: Sejtmanipulátor megfogásának és sejthez tapasztásának folyamata. Először az optikai csipesz 3 fókuszát a sztreptavidin fehérjével bevont sejtmanipulátor csapdázó gömbjeihez forgatjuk. A szerkezet csapdázását követően azt úgy fordítjuk, hogy a lapkája a biotinált sejt felé nézzen. Végül rövid ideig (kb. 10 s) a sejthez érintjük. B: A sejtmanipulátor elektronmikroszkópos képe. C: A sejt és a manipulátor forgatása az egyes koordinátatengelyek körül. D: A csapdázott sejt fluktuációjának mérése. Az optikai mikroszkópos felvételen az 1-es és a 2-es pontok a csapdázó gömbök közepét jelölik, amelyek fluktuációját a két kék pontsorozat ábrázolja. A 3-as, piros x-szel jelölt pont fluktuációját a piros pontsorozat ábrázolja.

8.2.2. Többnézetű mikroszkópia

Egyedi sejtek vizsgálatában az optikai mikroszkópia az egyik alapvető módszer. Itt nyilvánvaló cél egy adott sejtről a minél részletesebb és pontosabb 3 dimenziós leképezés elérése. Ennek a megfigyelési módnak az egyik jellegzetessége, hogy a felbontás az axiális irányban jóval kisebb, mint laterálisan. Adott λ hullámhosszon egy NA numerikus apertúrájú objektívvel a laterális felbontás $r_l = 0.61*\lambda/NA$, míg az axiális $r_a = 2*\lambda/NA^2$ (Rayleigh kritériumok). λ = 600 nm hullámhosszon 1.2 NA objektívet használva r_l = 305 nm és r_a = 830 nm értékeket kapunk, ami 2.7-szeres különbség. Egy 3D felvétel esetén ez azt jelenti, hogy a megfigyelt objektumok képei a tengely irányában megnyúlnak. Ez a képalkotási probléma leginkább a fluoreszcencia mikroszkópia esetében a legnyilvánvalóbb, és egy pontszerű

fényforrás leképezése esetén a legkönnyebben tetten érhető. Ennek képe, a pontkiszélesedési függvény (Point Spread Function, PSF) első közelítésben egy, az optikai tengellyel megegyező irányú nagytengellyel rendelkező ellipszoid alakját veszi fel.

A problémát természetesen többen többféleképen próbálták orvosolni, és megközelíteni az izotróp felbontást. Kísérleteztek pl. a minta strukturált megvilágításával: rács fénylap (lattice light sheet) kivilágítással számos sejtszintű biológiai folyamatot sikerült izotróp felbontással három dimenzióban követni széles időskálán [204]. A 4Pi mikroszkópiával az axiális felbontás növekedését két egymással szemben, konfokálisan elhelyezett objektív alkalmazásával érik el, ahol a két, ellentétes irányba terjedő nyaláb interferenciájának köszönhetően javul a felbontás [205]. Ezeknek a módszereknek a sorába illeszkedik a többnézetű mikroszkópia („multiview microscopy"), ahol a megfigyelendő objektumról egyszerre vagy egymás után több irányból készítenek felvétel sorozatokat, majd ezeket a fuzionálva kapnak közel izotróp felbontású 3D képeket [206-208]. A modern többnézetű mikroszkópok strukturált gerjesztő kivilágítással és konfokális detektálással tehetők igazán hatékonnyá [209, 210].



64. ábra. Irodalmi példák a minta forgatására a többnézetű mikroszkópiához. A: A megfigyelő objektív optikai tengelyére merőleges tengelyű kapillárisba ágyazott minta és annak forgatása fénylap gerjesztés (sötétebb kék terület) mellett [206]. B: Egyedi sejt forgatása optikai csipesz és lamináris áramlás kombinálásával. A sejt közüli parabolikus sebességprofil miatt a sejt felső részére nagyobb erő hat, mint az alsóra, nem nulla forgatónyomatékot hozva létre, miközben a sejtet kétnyalábos optikai csipesszel tartják egyhelyben [202].

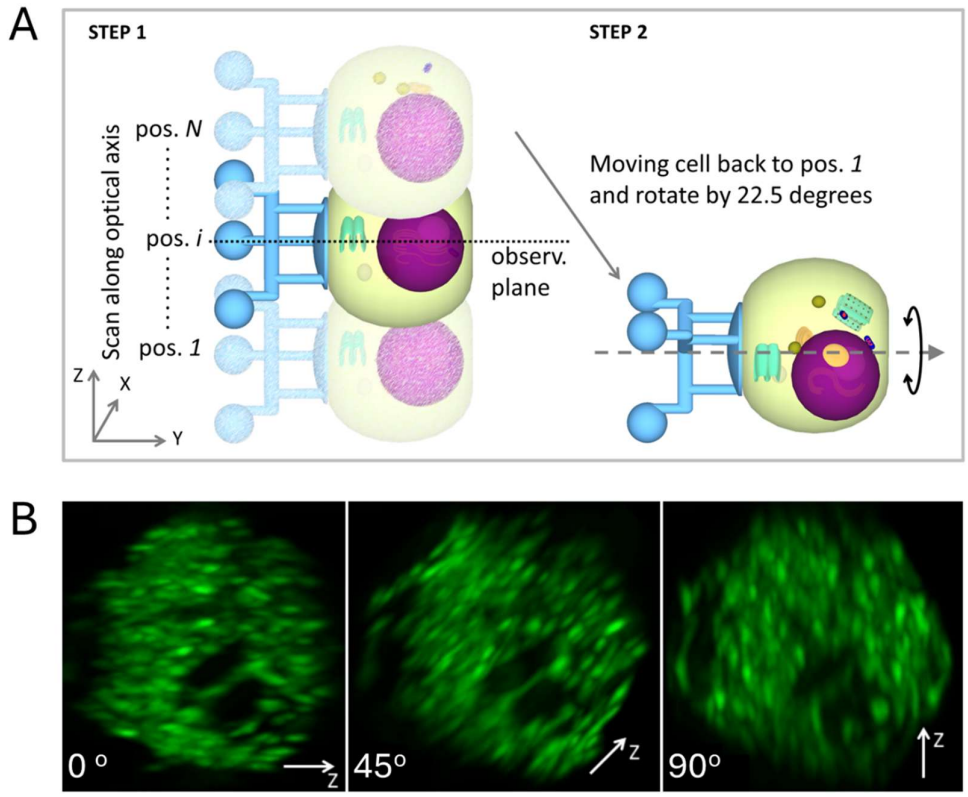
A fluoreszcens többnézetű mikroszkópos megfigyelésnek többféle megvalósítása lehetséges. A mintáról többirányú 3D felvételek elkészíthetők pl. két vagy több, egymáshoz képest szögben elhelyezkedő objektívvel, miközben sem a minta, sem az objektívek nem mozdulnak el [211, 212]. A felvételek azonban egyetlen objektívvel is elkészíthetők, ám ekkor a képsorozatok rögzítése között a mintát elforgatják egy, az optikai tengelyre merőleges tengely körül [207, 213]. Ebben az esetben kulcskérdés a minta forgatása, amire az egyik legelterjedtebb módszer az, amikor a - jellemzően többsejtes - mintát üvegkapillárisban

valamilyen, a táp- és salakanyagok által átjárható anyagba ágyazzák. A leképezéshez aztán az optikai tengelyre merőleges tengelyű kapillárist forgatják körbe saját tengelye körül a mikroszkóp fókuszában (64. ábra A, [206]). Egyedi sejtek leképezésénél már komplikáltabb megoldásokat szoktak használni, mivel ekkor a kapilláris forgatása esetében biztosítani kellene, hogy a megfigyelni kívánt sejt mindig a forgástengelyen vagy annak közelében legyen. Az elmúlt évtizedben egyedi, nem letapadó sejtek többé-kevésbe kontrollált körbeforgatására felhasználták már például azoknak elektroforézisen alapuló mozgatását [159, 203], akusztikus hullámokkal létrehozott folyadékáramlást [214], az optikai csipesszel való közvetlen csapdázást és körbeforgatást [215] vagy az optikai csipesszel kombinált folyadékáramlást is (64. ábra B, [202]). Ezek a módszerek vagy csak a sejtek folyamatos forgását tudják elérni és nem tudják adott pozícióban tartani a sejtet, vagy ha igen, azt csak a sejtek közvetlen optikai csapdázása által, ami pedig adott esetben sejtkárosodáshoz vezethet. Az egyedi sejtek indirekt optikai csapdázásával azonban elkerülhető a sejtek fotokárosodása, illetve tetszőleges pozícióban, tetszőleges ideig, nagyon kis fluktuációval tarthatók a sejtek.

Az indirekt csapdázás segítségével kidolgoztunk egy eljárást, amellyel a többnézetű mikroszkópiát támogatva a sejtekről izotróp felbontású 3D felvételek készíthetők [161]. Az indirekt sejtmanipulációhoz a 63. ábra B paneljén bemutatott 3 golyós szerkezetet használtuk, amit a sejtekhez való tapasztáshoz konkavalin A fehérjével vontunk be. Ez a fehérje a sejteket körülvevő glikokálixban található cukrokhoz kötődik, így ez a rögzítés nem igényli a sejtek előzetes kezelését. A mérésekhez glutáraldehiddel fixált K562 típusú, nem leapadó sejteket használtunk. A módszerrel elérhető feloldásjavulás kvantifikálásához a sejtek felszínéhez 100 nm átmérőjű fluoreszcens nanogyöngyöket kötöttünk, és ezek képeit értékeltük ki a felvételeken. A fluoreszcens megfigyelés közbeni csapdázást a többfókuszú, holografikus optikai csipesz rendszerünkkel (15. ábra) valósítottuk meg.

A mérés során az egyedi sejtekről az itt részletezett módon, több irányból fluoreszcens 2D képek sorozatát készítettük el, majd a képsorozatokat egyesítettük (65. ábra). A képsorozatok felvételében az indirekt sejtmanipulációt két módon használtuk fel. Egyrészt, egy adott orientációban tartva, a sejtet az optikai csipesz segítségével az optikai tengellyel párhuzamosan, 250 nm-es lépésekben mozgatva áttoltuk a fókuszsíkon, és minden egyes pozícióban készítettünk róla egy felvételt. A felvételek elkészülte után a sejtet visszamozgattuk a kiindulási pozícióba, majd szintén a csipesszel 22.5 fokkal elforgattuk egy, az optikai tengelyre merőleges tengely körül. Ebben az új pozícióban a sejt újbóli léptetése közben

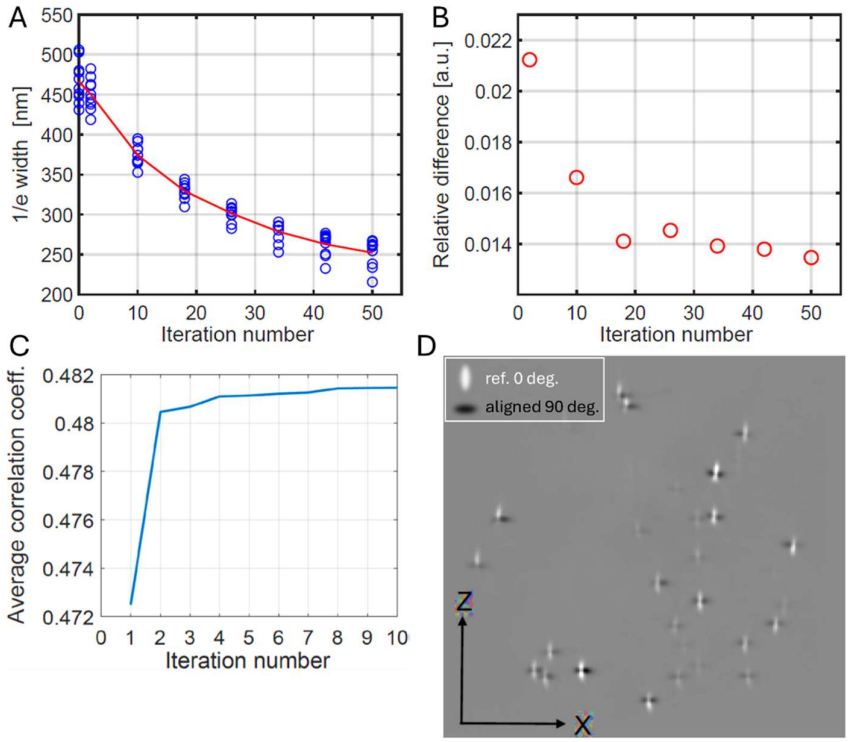
megismételtük a felvételkészítést. A sejtekről ily módon összesen 9 orientációban készítettünk képsorozatot.



65. ábra. A többnézetű mikroszkópiás felvételek. A: A felvételek elkészítése az optikai csipesszel indirekt módon megragadott és mozgatott sejttel. Az első lépés a sejtnek a megfigyelés síkján, adott lépésközzel történt átmozgatását ábrázolja. A második lépés a kiinduló pozícióba való visszamozgatást és az adott szöggel, az új orientációba való elforgatást ábrázolja. B: Fluoreszcens markerrel jelölt K562 sejt 3D felvételeiből maximum intenzitás projekcióval készített 2D képek három különböző orientációban. Az eredeti 3D felvételeket a sejthez képest azonos nézőpontba forgattuk.

A felvételeket követő képfeldolgozó eljárás az irodalomban található, többnézetű mikroszkópiában használt módszereken alapult, a lépései a következők voltak: i) 3D dekonvolúció, amivel a fókuszon kívül eső jelek nagy részét eltávolítottuk a képről, ii) a 3D felvételek egymáshoz igazítása, ahol a különböző irányú felvételeket azonos irányba forgattuk (regisztráció), majd végül iii) egy fúziós lépés, ahol az egyes 3D képsorozatok egymásak megfeleltetett pixeleinek intenzitás értékeit egyesítettük. Az eljárás végén egy darab 3D felvételt kaptunk eredményül.

A **dekonvolúcióhoz** a fluoreszcens leképező rendszer korábban megmért pontkiszélesedési függvényét, és az iteratív Richardson-Lucy algoritmust használtuk. Az iterációk számát a mikrogyöngyöknek az egyes iterációs lépések után kapott képeire illesztett Gauss görbék szélességéből, illetve a képeknek az előzőhöz viszonyított pixel intenzitás változásából határoztuk meg (66. ábra A, B). Azt találtuk, hogy 26 iteráció után a képekre illesztett Gauss görbék átlagos szélessége elérte az optikai rendszerünk felbontóképességét (kb. 300 nm), illetve a relatív pixel intenzitás sem csökkent tovább.



66. ábra. A képfeldolgozás lépései. A és B: Kritériumok a dekonvolúció iterációszámának megállapításához. A: Az egyes fluoreszcens gyöngyök képeire illesztett Gauss eloszlások szélességei az iteráció számának függvényében. A folytonos vonal az egyes csoportok átlagértékeit köti össze. B: Az egyes pixelintenzitások relatív változásainak összege az iterációszám függvényében. C: A különböző orientációban felvett képsorozatok egymáshoz forgatásához (regisztráció) használt korrelációs eljárás során kapott korrelációs értékek. D: Két 3D képsorozat maximum intenzitás projekcióval előállított 2D változata az egymással való regisztráció után. A Z tengely a referencia kép optikai tengelyével párhuzamos, amely irányba a fluoreszcens gyöngyök dekonvolúcióval javított képei megnyúltak.

A dekonvolúciós szűrés után a **regisztrációt** a következő direkt keresés algoritmussal végeztük el, ahol a 0 fokú orientációban rögzített képsorozatot használtuk referenciaképpen. Első lépésként a képsorozatokat manuálisan visszaforgattuk a 0 fokos pozícióba azzal a szöggel, amekkorával a szerkezeteket a mérés során elforgattuk (22.5°, 45°, ...). Ezután a szerkezet tengelye körüli 45°-os nyílásszögű térszögben létrehoztuk a forgástengelyek egy

halmazát. A következőkben minden egyes tengely körül elforgattuk a 3D felvételt a -15° – 15° tartományban 1 fokonként, és minden ilyen orientációban transzlációs korreláció segítségével megkerestük a referencia és az elforgatott felvételek közötti legjobb illeszkedést. Ezután kiválasztottuk a legmagasabb korrelációs koefficienst produkáló tengelyt, e körül létrehoztuk a következő forgástengely halmazt már csak feleakkora térszögben, majd újra elvégeztük a korreláció számításokat az új tengelyek körül elforgatott felvételeken. Ez az iteráció 10 lépés alatt (66. ábra C) mindig konvergált ahhoz a forgástengelyhez, ahhoz az elforgatás szöghöz és ahhoz a transzláció értékhez, amivel az adott orientációban rögzített felvételt transzformálva a referencia felvételhez legközelebb jutunk. A regisztrált felvételeken a fluoreszcens gyöngyök képeinek közepe átlagosan csupán ~130 nm-rel tér el a referencia felvételeken található képeinek közepétől (66. ábra D).

Az egymáshoz forgatott felvételek **fúzióját** egy Fourier-transzformáción alapuló módszerrel végeztük el. Ennek során először kiszámoltuk mindegyik megfelelően elforgatott és eltolt felvétel 3D Fourier-transzformáltját (I_j), majd ezeket pixelenként a közvetkező módon összegeztük:

$$I_f = \sum_{j=1}^{N} (w_j \, I_j) \tag{15}$$

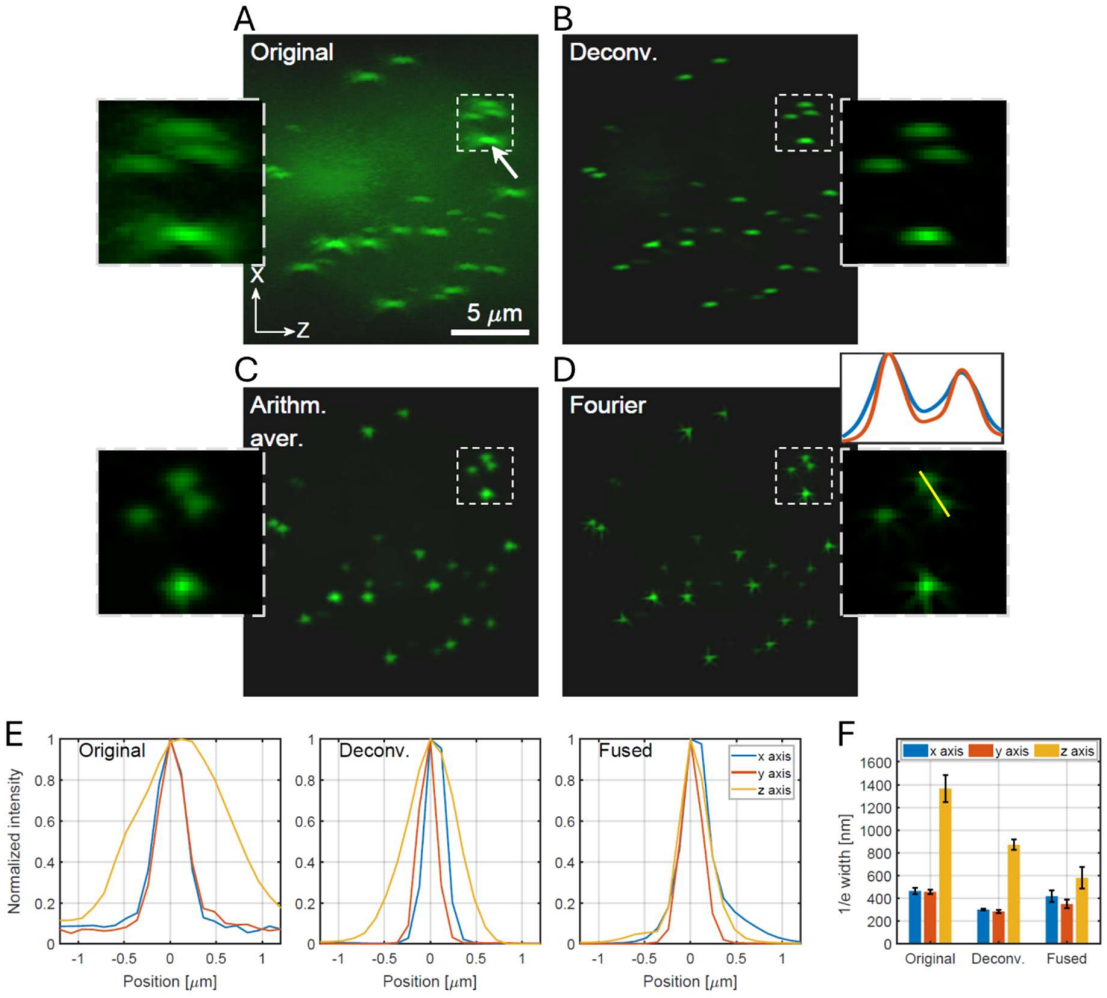
ahol N a felvételek száma és ahol a w_j súlyokat a Fourier amplitúdók segítségével számoltuk ki:

$$w_j = \frac{\sqrt{|I_j|}}{\sum_{i=1}^{N} \sqrt{|I_i|}} \tag{16}$$

A Fourier-térben ily módon összegzett I_f felvételt inverz Fourier-transzformálva megkaptuk a mikrogyöngyökkel dekorált sejt 3D fluoreszcens felvételét (67. ábra D). Az eljárás referenciájaként elvégeztük az egymáshoz regisztrált felvételek pixeleinek egyszerű algebrai összegzéses fúzióját is (67. ábra C).

A célul kitűzött feloldás javulás kiválóan tetten érhető a golyók képeinek optikai (z) tengely irányú méretváltozásában (67. ábra E, F). Ha a képek intenzitás profiljára Gauss görbét illesztünk, azt kapjuk, hogy az eredeti felvételeken ezek 1/e szélessége 1.37 μm-ről a fúzióval 0.58 μm-re csökkent, miközben az x és az y tengelyek menti szélesség 0.5 μm körüli maradt.

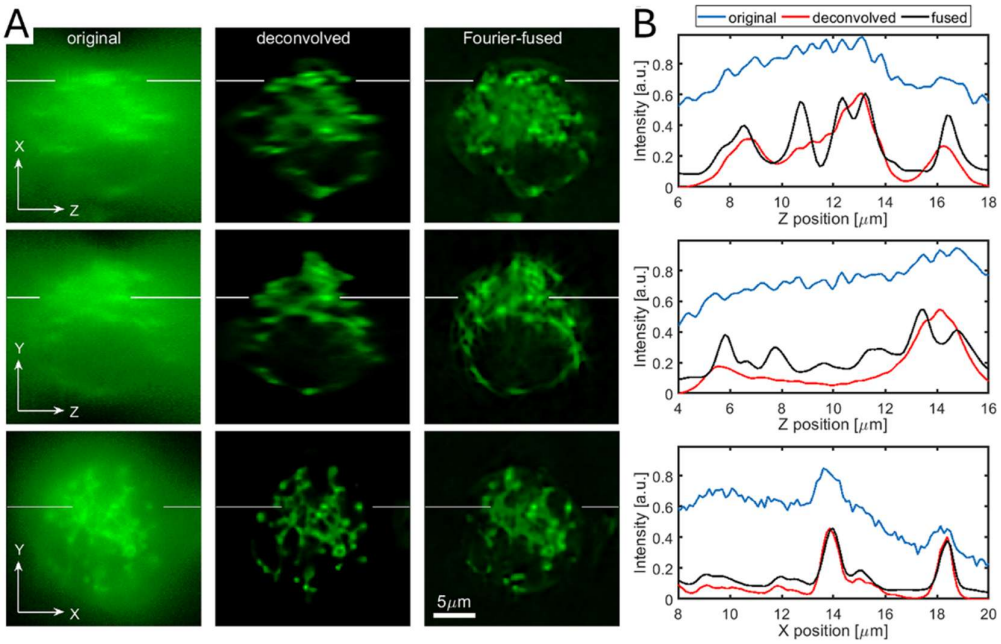
Érdekesség, hogy az optikai tengelyre merőleges tengelyek mentén a gyöngyök képeinek szélessége a dekonvolúció során enyhén csökkent, majd a fúzióval az eredeti méretre növekedett (67. ábra F). A csökkenés a dekonvolúció természetes velejárója, de a növekedés oka nem tisztázott: okozhatja a sejt fluktuációja, a mikrogyöngyök nem stabil rögzülése a sejten, a regisztrációs algoritmus említett átlagosan egy pixelnyi hibája, illetve ezek tetszőleges kombinációja.



67. ábra. Az optikai felbontás javulása mikrogyöngyökkel jelölt sejt esetében. A-D: A mikrogyöngyökről készült 3D felvételsorozat maximum intenzitás projekcióval előállított 2D változata a képfeldolgozás egyes lépései után. A D ábra kis képe a sárga vonal menti intenzitás eloszlás a matematika átlagolással (kék vonal) és a Fourier-transzformáción alapuló átlagolással (piros vonal) kapott képen. E: Az A ábrán nyíllal jelölt mikrogyöngy intenzitás eloszlása a három tengely mentén az egyes lépéseket követően. F: Az egyes tengelyek irányában mért intenzitáseloszlásokra illesztett Gauss görbék szélességei a képfeldolgozás egyes lépései után, a mikrogyöngyökre átlagolva.

A módszernek sejtalkotók leképezésére való alkalmazhatóságát is megvizsgáltuk olyan sejteken, melyeknek a mitokondriumát szelektíven megfestettük. A korábbi tapasztalatok

alapján itt csak 4 orientációban készítettünk felvételeket (0°, 45°, 90° és 135°), a dekonvolúciós lépésszám kritériumát pedig az egyes lépések után a felvételről kiszámolt Fourier teljesítményspektrumnak az optikai rendszerünk átviteli függvényétől való eltérése alapján határoztuk meg. A feloldás javulását jól mutatja az 68. ábra, ahol látszik, hogy egyrészt a dekonvolúció az eredetileg a fókuszsíkon kívüli területről érkező szórt fényt eltávolítja, másrészt pedig a fúzióval az eredetileg az optikai tengely irányában megnyúlt képletek megrövidülnek, számos egybe mosódott képlet pedig szétválik (68. ábra B).



68. ábra. Az optikai felbontás javulása mitokondriumában festett sejtek esetében. A: Az egyes sorokban a vizsgált sejtről készült 3D felvétel egy-egy síkbeli metszete látható a képfeldolgozás egyes lépései után. B: Az A ábrán a fehér vonalak közötti szakasz mentén mért fluoreszcencia intenzitás.

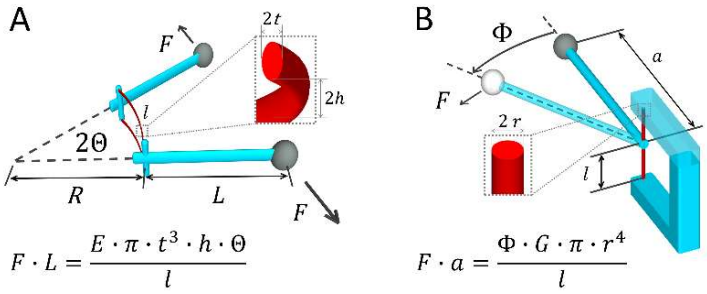
Összegzésképpen elmondható, hogy az egyedi sejtek indirekt optikai manipulációja alkalmas arra, hogy vele a sejteket nagy pontossággal megtartsuk mikroszkópos megfigyelés idejére, és tetszőleges irányba elforgatva felvételeket készítsünk róluk. Demonstráltuk, hogy a módszer alkalmas egyedi sejtek 3D fluoreszcens többnézetű mikroszkópiás képalkotására, amellyel ezen felvételek optikai tengely irányú felbontása nagyban javítható.

8.3. Sejtmanipuláció rugalmas mikrorobotokkal

Az eddigiekben bemutatott indirekt sejtmanipulációs eljárásokhoz a sejteket valamilyen kémiai vagy biokémiai módszerrel a csapdával megragadott és mozgatott szerkezethez kell tapasztani. Ehhez a szerkezetet mindenképpen, és gyakran a sejtet is valamilyen felületkezelésnek kell alávetni, és a tapasztás irreverzibilis, vagyis a sejtet nem lehet a

szerkezettől a későbbiekben elválasztani. A felületkezelést és az irreverzibilis tapasztást el lehet azonban kerülni egy új koncepciójú megközelítéssel, mégpedig deformálható rugalmas eszközök használatával [216]. Ekkor a köztes sejtfogó szerkezetek a makroszkopikus laborcsipeszhez hasonlóan rugalmasságuknak köszönhetően ragadják meg a sejteket, amiket bármikor el is tudnak engedni. A szükséges deformációt az optikai csipesz segítségével terveztük elérni. Fontos hangsúlyozni, hogy az optikai csipesz csak a szerkezetek nyitásához szükséges, miután a sejt a szerkezetbe kerül, azt ott csupán a szerkezetek rugalmassága tartja, az optikai csipesszel ehhez már nem kell erőt kifejteni. A csipeszt a megragadást követően már csak a szerkezet mintatérben való mozgatására használjuk. Az irodalomban több módszer is található az egyedi sejtek fizikai megragadására, mozgatására (pl. mikropipetta [217] vagy mikrofogók [218, 219]). Az optikai csipesz előnye ezekkel szemben az, hogy jóval kisebb erőt fejt ki a sejtre, és nem deformálja azt.

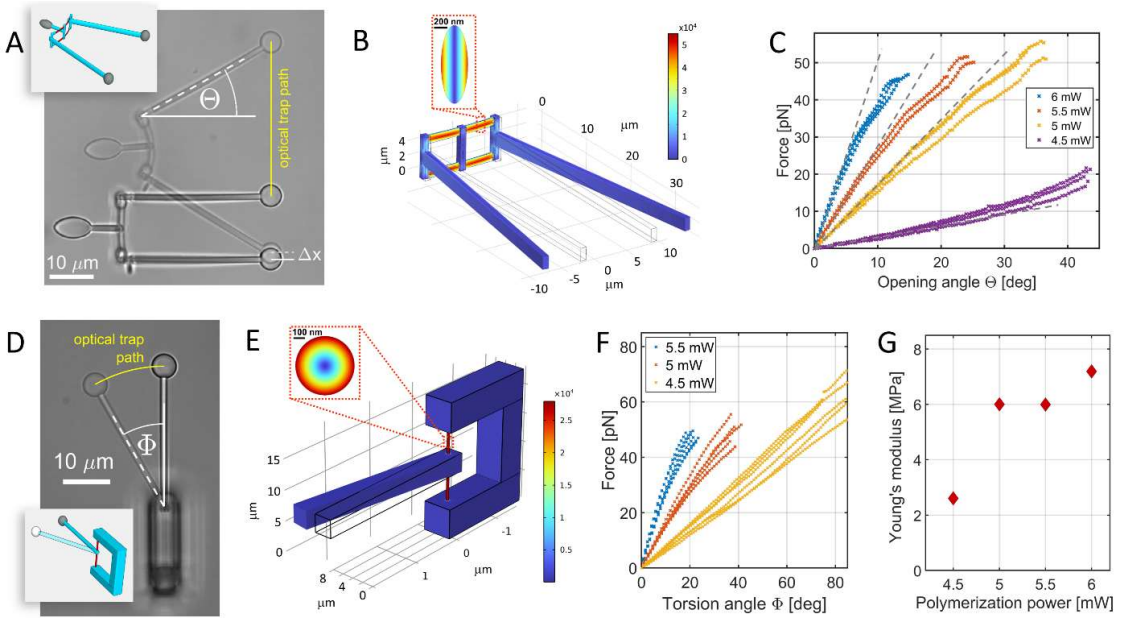
Korábbi eredményeink [220, 221] azt mutatták, hogy megfelelően megválasztott fotopolimert használva létezik olyan polimerizációs paramétertartomány (lézerteljesítmény és pásztázási sebesség), amivel az optikai csipesz által kifejthető erőkkel deformálható nanoszálakat lehet létrehozni. A nanoszálakat vagy hajlítással, vagy csavarással lehet deformálni, rugalmasságuk mértékét pedig éppen a polimerizációs paraméterekkel lehet hangolni. A nanoszálakat alkalmasan kialakított mikroeszközökbe építve azok az optikai csipesszel deformálhatóvá válnak.



69. ábra. Nanoszálak deformációjához szükséges erők. A: Két, nanoszállal (piros) összekötött merev rúd (kék) optikai csipesszel való szétnyitásának vázlatos ábrázolása, és az ehhez szükséges erő számolásának magyarázata. B: A torziós nanoszál (piros) optikai csipesszel való megcsavarásának vázlatos ábrázolása, és az ehhez szükséges erő számolásának magyarázata.

Ormocomp fotopolimer esetében megmutattuk, hogy az ebből készült nanoszálak Young-modulusa (YM) több nagyságrenddel kisebb, mint az anyag tömbi YM-a: 200 nm széles Ormocomp nanoszálak esetében az érték 3.5 MPa volt a tömbi anyag 1 GPa-os értékével szemben [221]. Ilyen rugalmassági együtthatóval jellemzett és megfelelő vastagságúra

készített szálak esetében a 69. ábra alján látható összefüggésekkel kiszámolható, hogy a meghajlításukhoz és csavarásukhoz néhányszor tíz pikonewton erő elegendő, ami erő már optikai csipesszel is kifejthető. A nanoszálakat megfelelően kialakított tesztszerkezetekbe illesztve meghatároztuk, hogy a polimerizáló lézerteljesítmény és a pásztázási sebesség hogyan befolyásolja a szerkezetek deformálhatóságát (70. ábra C, F). Ez a két paraméter elsősorban a nanoszálak keresztmetszetét módosítja, ami a deformálhatóságoz szükséges erőt befolyásolja alapvetően. A hajlítást vizsgáló tesztszerkezeteknél a nanoszálakat két merev kar közé készítettük el (70. ábra A), melyek végét optikai csipesszel távolítottuk egymástól. A csavarásos méréseknél a nanoszál közepéhez polimerizáltunk egy merev szálat, és annak a végét mozgattuk a csipesszel egy körív mentén (70. ábra D).



70. ábra. A nanoszálak deformációjához szükséges erők mérése. A: A hajlítható nanoszál deformációja mérésének optikai mikroszkópos felvétele. Kis kép: a deformált tesztszerkezet sémája. B: A von Mises stressz eloszlása az A ábrán mutatott szerkezetben hajlítás közben COMSOL Multiphysics programmal számolva. C: Az A ábrán mutatott szerkezet különböző kihajlítási szögeihez szükséges erő értékek négy eltérő polimerizációs teljesítménnyel készített nanoszál esetében. A polimerizáció pásztázási sebessége 20 μm/s volt. D: A csavarható nanoszál deformációja mérésének optikai mikroszkópos felvétele. Kis kép: a deformált tesztszerkezet sémája. B: A von Mises stressz eloszlása a D ábrán mutatott szerkezetben csavarás közben COMSOL Multiphysics programmal számolva. F: A D ábrán mutatott szerkezet különböző csavarási szögeihez szükséges erő értékek három eltérő polimerizációs teljesítménnyel készített nanoszál esetében. A polimerizáció pásztázási sebessége 20 μm/s volt. G: A C ábrán látható erőgörbék kezdeti lineáris szakaszaiból számolt Young-modulus értékek a négy eltérő teljesítménnyel készített nanoszál esetében.

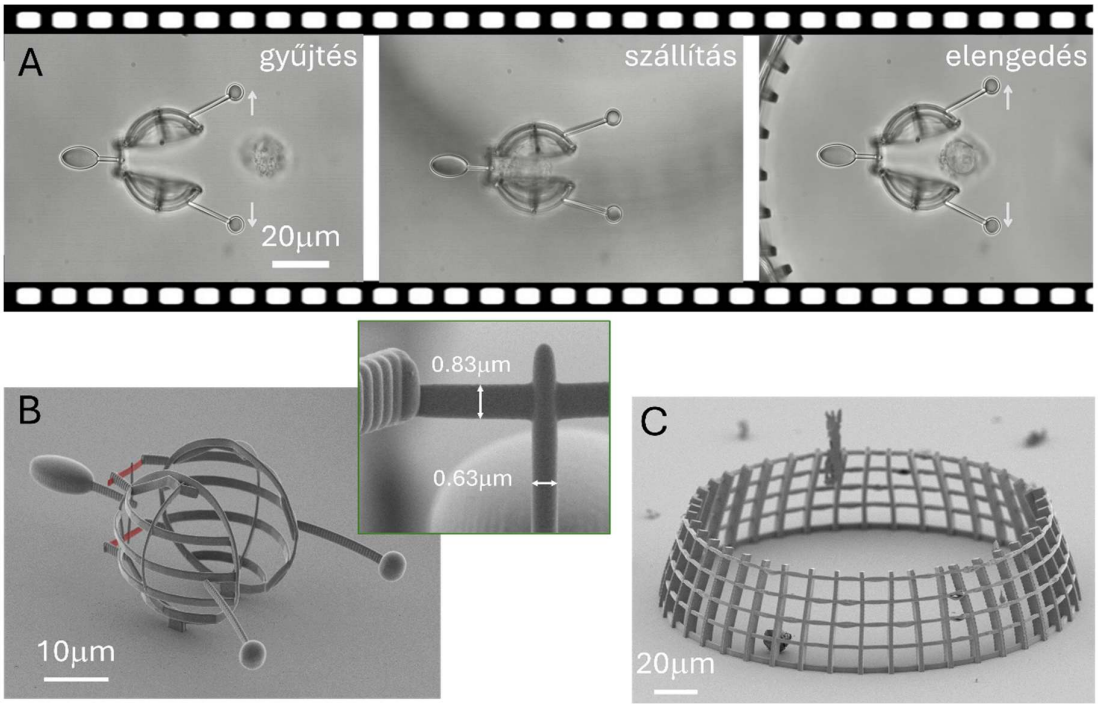
A hajlított nanoszálak esetében méréseink azt mutatták, hogy a 4.5 mW – 6 mW tartományba eső polimerizáló teljesítménnyel, 20 μm/s pásztázási sebesség mellett lehet készíteni az optikai csipeszünkkel (F < 60 pN) meghajlítható szálat. A kisebb teljesítménnyel

készített szálakkal szerelt szerkezetet 20 pN erővel akár 40 fokra is ki lehet nyitni, míg a vastagabb, 6 mW-tal készített szállal rendelkezőt 47 pN erővel is csupán 15 fokra (70. ábra C). A csavarásra tervezett nanoszálak esetében hasonló tendencia mutatkozott, ahol az optikai rendszerünkkel deformálható szálakat 4.5 mW és 5.5 mW közötti teljesítménnyel lehetett készíteni. Itt a legkisebb vastagságú szálakat több, mint 90 fokkal is el tudtuk csavarni, míg a legvastagabbakat csupán 20 fokkal (70. ábra F). Ez a deformációs tartomány alkalmas a gyakorlatban is használható szerkezetek készítésére, és a továbbiakban bemutatott eszközökbe 5 mW teljesítmény és 20 μm/s pásztázási sebességgel készített nanoszálakat illesztettünk. Fontos további eredmény, hogy az erő-hajlítási szög függések kezdeti, lineáris szakaszaiból a nanoszálak YM-a - vastagság és hossz adataik ismeretében - meghatározhatóvá vált (70. ábra G). Méréseink szerint a polimerizációs lézerteljesítmény a szálak vastagságán kívül az YM-át is befolyásolja: 4.5 mW-nál 2.6 MPa értéket kaptunk, míg 6 mW-nál 7.2 MPa-t, ami korábbi eredményeinkkel teljesen egybevágott.

A rugalmas sejtmanipulátorokban rejlő lehetőségek demonstrálására három, alapvetően más feladatot ellátó szerkezetet készítettünk. Az elsővel a sejtek egyszerű összegyűjtését lehet elvégezni. Itt törekedtünk olyan szerkezet készítésére, ami a sejtekre szállítás közben szinte egyáltalán nem fejt ki nyomóerőt, mégis stabilan megtartja őket. A második a sejtek mikroszkópos vizsgálatában segít oly módon, hogy azokat minimális fluktuációval stabilan tartja, miközben tetszőleges irányban el lehet őket forgatni és róluk felvételeket lehet készíteni. A harmadik szerkezet tulajdonképpen egy szerkezet pár, amivel sejtek közötti kölcsönhatást lehet időben és térben jól kontrollálható módon előidézni. A páros egyik tagjával egy sejtet a mintatér aljához lehet stabilan rögzíteni, míg a másikkal egy második sejtet megfogni és az elsőhöz hozzányomni.

A mikroeszközöket a nanoszálakon kívül még két funkcionális egység alkotta: az egyik egy merev rudakból álló váz, a másik pedig az optikai csipesszel való megfogást segítő gömb vagy ellipszoid. Mindegyik szerkezetbe ugyanakkora, 4.5 μm átmérőjű csapdázó gömböket polimerizáltunk, amelyeket a csapdázó lézerünk maximális teljesítményével megragadva kb. 30 pN/μm csapdaállandó jellemzett. A demonstrációs kísérletekhez a humán K562 tenyésztett sejtvonal glutáraldehiddel fixált sejtjeit használtunk, amelyek a mintában 1% szarvasmarha szérumalbumint (BSA) tartalmazó, foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) úsztak.

8.3.1. Sejtgyűjtő mikroeszköz



71. ábra. A sejtgyűjtő mikroeszköz. A: A sejtgyűjtés folyamata egyes lépéseinek optikai mikroszkópos felvétele. A begyűjtés a hordozó felületen, a szállítás a felület felett kb. 30 μm-rel, a kiengedés a felület felett kb. 10 μm-rel történik. A nyilak az optikai csipesszel megfogott gömbök mozgatásának irányát jelölik. B: Sejtgyűjtő mikroeszköz elektronmikroszkópos képe. Kis kép: a felső rugalmas szál és azt az alsóval összekötő rúd képe, vastagságaikkal. C: A sejttároló terület elektronmikroszkópos képe.

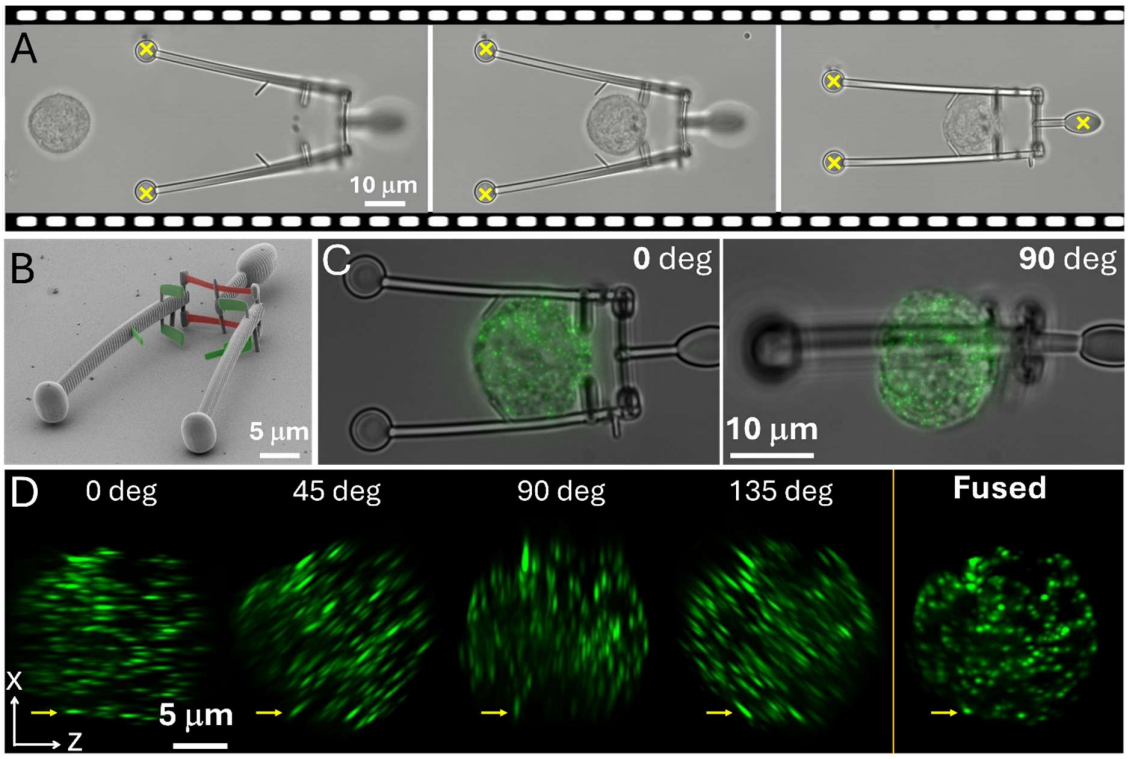
Ezt az eszközt arra terveztük, hogy vele valamilyen szempont szerint kiválasztott, nem letapadó sejteket lehessen a mintatérben befogni, majd egy adott helyre szállítani és ott összegyűjteni. A szerkezet sejtbefogó része két, hajlítható rugalmas nanoszálak által összekötött fél gömbhéjból állt, melyekre egy-egy merev rudat illesztettünk, a rudak végein pedig egy-egy csapdázó gömb helyezkedett el, amelyeknél fogva az eszközt az optikai csipesszel szét lehetett nyitni (71. ábra B). A gömbhéjakat csupán néhány merev ívből készítettük el, hogy a mintában lévő folyadék a mozgatás közben minél kisebb viszkózus erőt fejtsen ki rájuk. A sejtgyűjtés folyamat (71. ábra A) elején a merev rudak végeit megragadtuk az optikai csipesszel, szétnyitottuk a két gömbhéjat, majd megközelítettük a kiválasztott sejtet. A nyitott szerkezetet helyben tartva a mintaasztal mozgatásával sejtet a gömbhéjak közé manővereztük, majd a szerkezetet bezártuk. Ezután a három csapdázó gömb segítségével felemeltük a szerkezetet a mintatér aljáról és egy erre a célra polimerizált tartó keret (71. ábra C) fölé mozgattuk. A keretbe ezután leeresztettük a sejtgyűjtőt, szétnyitottuk, majd felfele mozgatva a sejt kiesett belőle a keret belsejébe.

A két gömbhéj méretét úgy választottuk meg, hogy nem nyomták össze a sejtet, ami így a szállítás során abban szabadon mozoghatott. Méréseink szerint a szerkezetet maximálisan kb. 300 μm/s sebességgel lehet vizes közegben mozgatni. Ezzel a módszerrel kb. 3-4 percenként lehet egy sejtet a keretbe összegyűjteni. A sejtgyűjtő potenciális alkalmazási területe lehet sejtszferoidok vagy organoidok kiindulási sejtjeinek adott, kis területre való összegyűjtése.

8.3.2. Sejtcsipesz mikroszkópos megfigyeléshez

Az egyedi sejtek mikroszkópos megfigyelését segítő mikroeszköz hasonlít leginkább funkciójában egy makroszkopikus laborcsipeszhez: két merev rúdja közé lehet a sejtet befogni, amit a szerkezet rugalmassága tart a helyén. A két, hajlítható nanoszállal összekötött rúdra egyenként három-három rövid rudacskát polimerizáltunk, amelyek közrefogják és helyben tartják a sejtet (72. ábra A-C). A sejt befogása hasonló az előző szerkezetnél látotthoz: optikai csipesszel megragadva a merev rudak végén lévő egy-egy gömböt, szétnyitjuk őket, majd a sejtet a kis rudacskák közé mozgatva összezárjuk (72. ábra A). Ekkor a nanoszálak rugalmassága miatt a kis rudacskák az optikai csipesz nélkül is kissé összeszorítják a sejtet, ami a szerkezethez képest már rögzített helyzetben lesz. A szerkezet három csapdázó gömbjét ezután megragadva a csipesszel, a sejt tetszőleges irányba mozgatható és tetszőleges orientációba elforgatható (72. ábra C). Képanalízissel meghatároztuk a sejt laterális fluktuációját, aminek félértékszélessége kevesebb, mint 30 nm, vagyis a képalkotáshoz elegendően stabilan lehet tartani a sejtet (73. ábra A). A szerkezet méretei, rúdjainak a sejtbefogáskor bezárt szöge és a 70. ábra C grafikonjáról leolvasható F_{cs} erő vs. Θ szög függése ismeretében megbecsültük azt az erőt, amivel az egyes kis rudacskák a sejtet nyomják. Azt kaptuk, hogy egy-egy rudacska 4 pN -15 pN erővel tartja a sejtet, és mikroszkópos megfigyeléseink szerint ekkora erő mellett a sejtek egyáltalán nem deformálódnak.

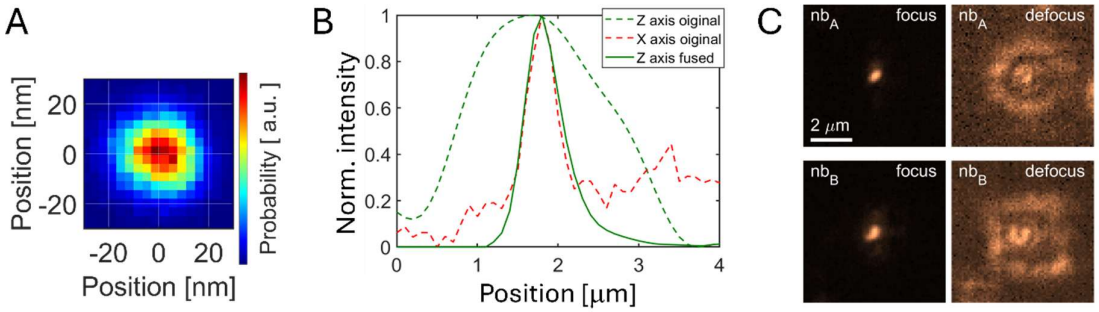
A sejtcsipesznek az optikai mikroszkópos képalkotásban való alkalmazhatóságát a 8.2.2 fejezetben bemutatott többnézetű mikroszkópiás módszerrel demonstráltuk. Az ott látotthoz hasonlóan itt a sejtcsipesz feladata a megfogott sejtnek az optikai tengely menti pontos eltolása és egy arra merőleges tengely körüli pontos elforgatása volt. A mérésekhez ezúttal is fluoreszcens mikrogyöngyökkel jelölt, nem leapadó K562 típusú sejteket használtunk. A 3D felvételek készítésének lépései, vagyis a sejt optikai tengely irányú eltolása és adott szöggel való elforgatása, valamint a kiértékelés módja is megegyezett a 8.2.2 fejezetben bemutatottakkal.



72. ábra. Többnézetű mikroszkópiához használt mikroeszköz. A: Egyedi K562 sejt sejtcsipesszel való befogásának egyes lépései. A sárga keresztek a csipesz fókuszpozícióit jelzik. B: A sejtcsipesz elektronmikroszkópos képe. Pirossal a két rugalmas szálat, zölddel a hat sejtfogó rudacskát emeltük ki. C: Fluoreszcens gyöngyökkel jelölt sejt sejtcsipesszel tartva, két egymásra merőleges orientációban. Zölddel a sejt fluoreszcens képét vetítettük a sejt és a szerkezet együttesének világos látóterű felvételére. D: Egy fluoreszcens sejt négy irányból készült 3D felvételének maximum intenzitás projekcióval készített képei a képfeldolgozó folyamat dekonvolúciós és regisztrációs lépései után, illetve a Fourier-transzformáción alapuló fúzióval megalkotott felvétel. A sárga nyíl egy kiválasztott, az összes felvételen jól átható gyöngy képére mutat.

A csapdázott sejt említett csekély fluktuációja lehetővé teszi a fluoreszcens golyók elnyújtott képeinek elmosódás nélküli megfigyelését a dekonvolúciós lépés után, valamint a négy különböző irányú felvétel sikeres fúzióját is (72. ábra D). Az optikai tengely irányában megvalósított feloldásjavulást a 72. ábra D paneljén sárga nyíllal megjelölt mikrogyönggyel mutatom be: a gyöngy képének z tengely irányú intenzitás mintázata azt mutatta, hogy az eredetileg 2.1 µm-re megnyúlt kép mérete a fúzió után 0.6 µm-re csökkent (73. ábra B).

Fontos megjegyezni, hogy a sejtcsipesz szerkezetnek vannak olyan elemei, amelyek befolyásolhatják a leképezést, amikor a sejt és az objektív közé kerülnek. Ennek hatását a 73. ábra C paneljének alsó két képén egy olyan gyönggyel demonstrálom, aminek leképezését torzította a sejtcsipesz merev rúdja. Látható, hogy a fókuszban lévő takart gyöngy képe nem pontszerű, hanem enyhém torzult, defókuszálva pedig a diffrakciós mintázata nem körszimmetrikus. Ez a torzulás azonban a gyakorlatban nem akadályozta a többnézetű felvételek sikeres fúzióját, mivel a többi felvételen az adott gyöngy képe torzításmentes volt. Összegezve elmondható tehát, hogy a kis fluktuáció miatt a rugalmas sejtcsipesszel tartott sejtek leképezése tetszőleges irányból, gyakorlatilag torzításmentesen megvalósítható.



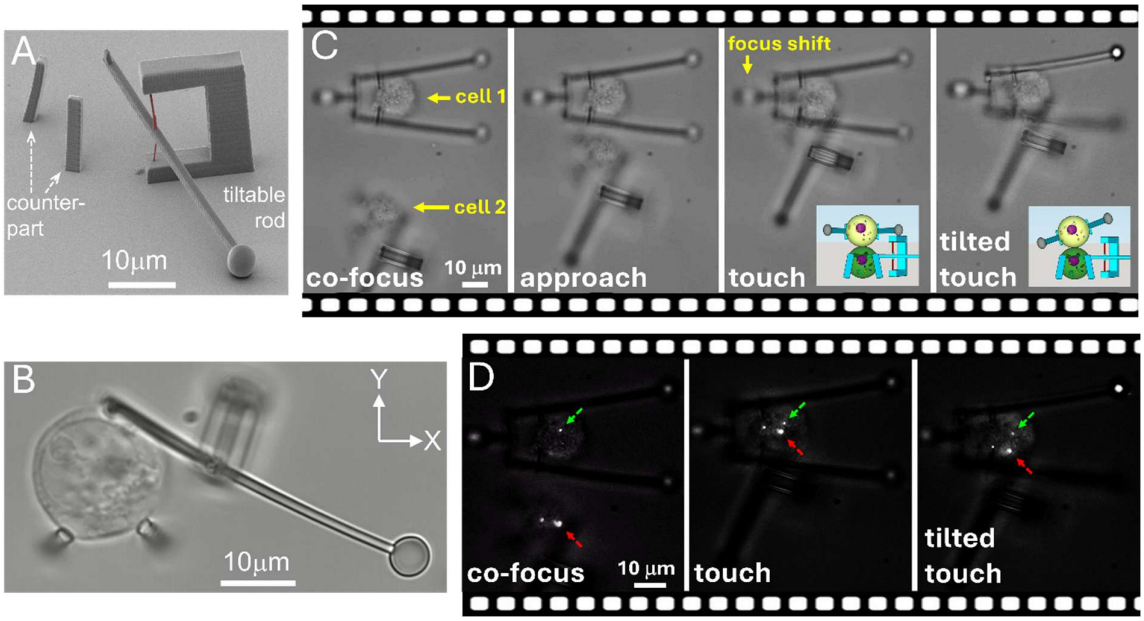
73. ábra. Sejtcsipesszel tartott sejt jellemzése. A: A sejtcsipesszel tartott sejt pozícióeloszlása a két laterális tengely mentén. B: A sejtcsipesszel mozgatott sejt felszínén lévő fluoreszcens mikrogyöngy vonalmenti intenzitáseloszlása a Z és az X tengelyek mentén. A zöld vonalak a Z irányú feloldásjavulást mutatják. C: Fluoreszcens mikrogyöngy képe a sejtcsipesz egy rúdja által takarva (alsó sor, nb_B) és takarás nélkül (felső sor, nb_A).

8.3.3. Sejt-sejt kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas szerkezet

Az indirekt manipulációval létrehozott sejt-sejt kölcsönhatás legnagyobb előnye azzal szemben, amikor ezt két sejtszuszpenzió egyszerű összekeverésével érik el az, hogy ez a módszer lehetőséget nyújt a kölcsönhatás tér- és időbeli kontrollálására. Vagyis egyrészt bizonyos keretek között meghatározhatjuk, hogy a sejteket melyik felületükkel érintjük össze (vagy egy jól meghatározott távolságban tartjuk őket egymástól), másrészt pedig a kölcsönhatás pontos kezdetét is ismerjük, és így megfigyelhetjük a folyamatok időbeli lefolyását. Ez az eszköz tulajdonképpen egy szerkezet páros, amelynek az egyik (sejtrögzítő) tagjával a sejtet mozdulatlanul a mintatér aljához lehet rögzíteni, míg a másikkal (sejtmozgató) egy második sejtet az elsőhöz lehet manőverezni. A sejtek egymáshoz érintését két párossal is demonstráltuk, melyeket specifikusan axiális, illetve laterális megközelítésre terveztünk. Itt érdemes megjegyezni, hogy az egyébként nem letapadó sejtek néhány esetben maguktól mégis

kitapadnak a mintatér aljához. Ebben az esetben az első szerkezetre nincs szükség, és a második sejtet ekkor ténylegesen szinte tetszőleges irányból a letapadthoz lehet érinteni.

Az axiális megközelítés esetében a sejtrögzítő szerkezet (74. ábra A, B) egy merev keretbe polimerizált torziós szálból, egy ehhez rögzített merev rúdból és két ellendarabból áll. A merev rudat az optikai csipesz egyik csapdájával el kell forgatni, majd egy másik csapdával a sejtet a másik vége és az ellendarabok közé vinni. A csapdák kikapcsolása után a torziós szál rugalmassága a rúd végével a sejtet az ellendarabokhoz nyomva rögzíti. Meg kell jegyezni, hogy eközben a sejtet rövid ideig direkt módon csapdázzuk, de ezt az időt minimalizálni lehet kb. 30 másodpercre, ami a legtöbb esetben kevés a sejt fotokárosodásához. A sejtrögzítő szerkezetbe befogott sejt (74. ábra C) fluktuációját 30 nm-nek és 40 nm-nek mértük a két laterális koordináta mentén. A sejtmozgató szerkezet az előző fejezetben bemutatott sejtcsipesszel azonos, és azonos módon is használható.



74. ábra. Sejt-sejt kölcsönhatás megvalósítása axiálisan mozgatott sejttel. A: Sejtrögzítő szerkezet elektronmikroszkópos képe. Pirossal a csavarható nanoszál rudat emeltük ki. B: K562 sejt egy sejtrögzítő szerkezetbe befogva. C: Sejt-sejt kölcsönhatás megvalósításának egyes lépései axiális megközelítéssel világos látóterű mikroszkópiával. A harmadik képen a fókuszeltolódást az alsó sejtnek a felsőhöz nyomódása okozza. A negyedik képen a sejtmozgató szerkezetet 15 fokkal elforgattuk az eredeti helyzethez képest, amit a csapdázó gömbök nagyon eltérő képe is jelez. D: Sejt-sejt kölcsönhatás megvalósításának egyes lépései axiális megközelítéssel fluoreszcens mikroszkópiával. A nyilak egy-egy, a sejtmozgatóval (zöld), illetve a sejtrögzítővel (piros) megfogott sejten lévő fluoreszcens gyöngyre mutatnak.

A sejtek közötti kölcsönhatás megvalósításához (74. ábra C) a sejtmozgatóba befogott sejtet az optikai csapdával úgy pozícionáltuk, hogy az alsó felülete volt a mikroszkóp

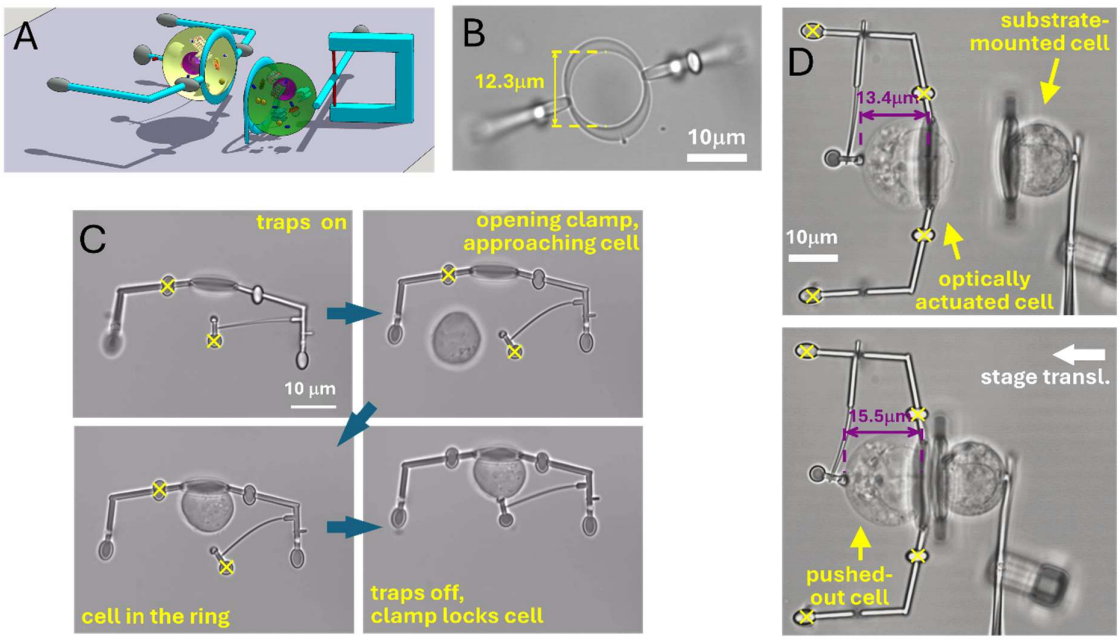
fókuszsíkjában, majd ezt a felületet a lerögzített sejt felső felületével hoztuk egy magasságba. Ezután a mintaasztal mozgatásával a rögzített sejtet a csapdázott alá toltuk. A két sejt érintkezését az mutatta, hogy a csapdázott sejt ekkor enyhén megbillent vagy felfelé tolódott, amit a szerkezet elfókuszálódásából láthattunk. A csapdázott sejtet a sejtmozgató szerkezettel kis mértékben el is tudjuk forgatni (kb. ±20°, 74. ábra C, „tilted touch"), amivel befolyásolni tudjuk, hogy a sejtmembránoknak melyik részei érintkezzenek. Fluoreszcens mikrogyöngyökkel megjelölt sejteket használva ezek a mozgások pontosabban nyomon követhetők (74. ábra D). Az axiális mozgatási iránynak, illetve a sejtek egymás fölötti elhelyezkedésének előnye az, hogy így a sejtek érintkező membránjait azok normálisa felől figyelhetjük meg, ezért a kölcsönhatás miatt bekövetkező esetleges fehérje-átrendeződéseket fluoreszcens mikroszkóppal könnyen nyomon lehet követni.

A laterális megközelítéshez (75. ábra A) a sejtrögzítő szerkezet ellendarabja egy kör alakú nyílás, amibe a csipesszel elforgatott, majd elengedett merev rúd a sejtet úgy nyomja bele, hogy annak membránja oldalról válik elérhetővé. Ehhez a megközelítéshez a sejtmozgató szerkezetet teljesen újra kellett tervezni. A merev részét négy darab csapdázható ellipszoiddal láttuk el, amivel a teljes szerkezetet lehet tetszőleges irányba transzlálni és két tengely körül akadály nélkül körbeforgatni. A sejtmozgató közepén szintén egy kör alakú nyílást helyeztünk el (75. ábra B), amibe a mozgatott sejt illeszkedik bele. A szerkezet rugalmas része egy hajlítható nanoszál, ami az egyik végén a szerkezethez kapcsolódik, a másik végén pedig egy csapdázható gömb van. Ezt a gömböt a szerkezettől a rugalmas szál ellenében elhúzva keletkezik egy megfelelően nagy rés ahhoz, hogy egy sejtet belemanőverezzünk (75. ábra C). Ezt követően a csapdát kikapcsolva a rugalmas szál a vele szemben lévő kör alakú nyílásba szorítja a sejtet.

Az összeérintéshez a két sejtet egy magasságba kell hozni, hogy a körgyűrűkön kívül lévő érintkező felületeik a fókuszsíkban legyenek. Ezután a mozgatható sejtet laterális mozgatással egyszerűen a lerögzített sejthez nyomjuk. Az érintkezésre a sejteknek a szerkezetekhez képest megfigyelhető elmozdulásából következtethetünk. Ha a sejtek az egymáshoz nyomás során a két szerkezetbe illesztett gyűrűkből kissé ki is mozdulnak, azokat a rugalmas elemek a szerkezetben tartják, és az érintkezés megszüntetése után visszanyomják a gyűrűbe. Ezt a 75. ábra D paneljén láthatjuk, ahol a mozgatható sejt az egymáshoz nyomás során a gyűrűből kb. 2 μm-re kimozdul, de a nanoszál rugalmassága a szerkezetben tartja. A laterális megközelítés nagy előnye, hogy közben mindkét sejtet egyszerre láthatjuk anélkül,

hogy kitakarnák egymást. A sejtek érintkező felületét ezzel a módszerrel azok közös síkjában lehet megfigyelni. Azonfelül, hogy a kölcsönhatás során esetleg bekövetkező membránfehérje átrendeződéseket meg lehet figyelni, a szerkezet alkalmas arra is, hogy amennyiben a két sejt összetapad, a szétválasztásukhoz szükséges erőt meg lehet mérni feltéve, hogy az kisebb, mint a csipesszel kifejthető optikai erők (tipikusan <50 pN).

Ezekkel az eredményeinkkel megmutattuk, hogy alkalmasan tervezett puha, deformálható mikrorobot szerkezetekkel az egyedi sejtek indirekt optikai manipulációját a korábbiaktól eltérően, a sejtek kezelése nélkül is meg lehet valósítani. Ehhez fontos részeredmény volt, hogy megmutattuk, hogy az alkalmazott Ormocomp fotopolimer egyik anyagi jellemzője (Young-modulusa) a nanométeres dimenziókban nagyságrendekkel kisebb, mint a tömbi formában. Többféle sejtmozgatási sémát alkalmazó alapkísérletekkel sikeresen demonstráltuk, hogy ezek a szerkezetek hatékonyan használhatók a sejtek egyszerű mozgatásában vagy akár összetettebb vizsgálatában is.



75. ábra. Sejt-sejt kölcsönhatás megvalósítása laterálisan mozgatott sejttel. A: A kölcsönhatás megvalósításának sematikus rajza. B: A sejtmozgató szerkezet gyűrű alakú része: A belső átmérője egy átlagos sejt méretének 70-80 %-a. C: Egy úszó egyedi sejt befogásának egyes lépései. D: Sejtek egymásnak érintése laterális megközelítéssel. Az alsó képen az érintkezés után a bal oldali sejt kb. 2 µm-nyit kimozdul az őt tartó gyűrűből. A sárga keresztek a csapdák fókuszának helyét jelzik.

8.4. Összegzés

1. Optikai csipesszel mozgatható fényvezető szálat készítettem lokalizált, többirányú fluoreszcens gerjesztés megvalósításához. A fluoreszcens mikroszkópnak az optikai tengellyel párhuzamos irányú gerjesztésével szemben, a mobil egymódusú szállal a gerjesztést bármely, az optikai tengelyre merőleges irányban meg lehet valósítani. Ezen felül megmutattam, hogy az eszközzel a gerjesztést lokalizálni lehet egy kb. 1 μm^2-es területre. A szál geometriai paramétereinek alkalmas megválasztásával, annak kompakt méretét megtartva, minimalizáltam a fény irányváltozása miatti veszteséget.

2. Megmutattam, hogy a sejtek indirekt optikai manipulációjára kidolgozott eljárásunkkal 15 μm átmérőjű egyedi sejtet alkalmas mikroeszközzel víz közegben, a két laterális irányban 50 nm-es, illetve 120 nm-es félértékszélességű fluktuációval lehet egyhelyben tartani, ami alkalmassá teszi képalkotásban való alkalmazásra.

3. Az egyedi sejtek indirekt optikai manipulációjának eljárását felhasználtam a hagyományos fluoreszcens képalkotás inherens módon kisebb optikai tengely irányú 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. Az izotróp felbontás eléréséhez szükséges, a szakirodalomban található képfeldolgozó eljárásokat adaptáltam az optikai csipesszel segített felvételek kiértékeléséhez. Megmutattam, hogy az alkalmazott módszerünkkel lehetséges az optikai tengely irányú felbontás körülbelül 2.4-szeres javítása, ami közel izotróp felbontást eredményez.

4. 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, valamint a megragadott sejtek tetszőlegesen el is engedhetők. A módszerhez szükséges volt alkalmas fotopolimert és megfelelő polimerizációs paramétereket választva olyan, szub-mikrométeres keresztmetszetű polimer szálak előállítása, amelyeket az optikai csipesz néhányszor tíz pikonewtonos erővel deformálni képes. A szálakat jellemeztem a meghajlításukhoz és megcsavarásukhoz szükséges erőnek a polimerizációs teljesítménytől való függésével, amiből meghatároztam Young-modulusukat is. A szálakat megfelelően kialakított szerkezetbe integrálva, sejtmanipulációs feladatok elvégzésére alkalmas deformálható mikroeszközöket készítettem. Optikai csipeszes mozgatással

demonstráltam kiválasztott egyedi sejtek előre megadott területre való összegyűjtését, egyedi sejtről többnézetű mikroszkópiával történő felvételek készítését, valamint időben és térben kontrollált sejt-sejt kölcsönhatás kialakításának lehetőségét.

Releváns publikációk

Palima D. et al. OPTICS EXPRESS 20:2004-2014. (2012)
Vizsnyiczai G. et al. SPIE PROC 9922: 992216. (2016)
Vizsnyiczai G. et al. BIOMED OPTICS EXPRESS 11:945-962. (2020)
Iványi G. et al. ADV MATER 36:2401115. (2024)

9. Összefoglalás és tervek

Disszertációmban a kétfotonos polimerizáció (TPP) módszerének fejlesztését és az ezzel a módszerrel készített mikroeszközöknek biológiai és fizikai vizsgálatokban való alkalmazását mutattam be. Amikor bekapcsolódtam ebbe a kutatómunkába, a technológia még világviszonylatban is eléggé újnak számított, viszonylag kevés, de annál fontosabb alappublikáció jelent csak meg. Az Ormos Pál vezette csoport ebben az értelemben úttörőnek számított, és aktívan részt vett a TPP fejlesztésében [8, 113]. A kezdeti időszakban a mikroeszközök alkalmazásai elsősorban mikromechanikai rendszerek fejlesztését, illetve ezek segítségével biológiai jelenségek mikroméretekben történő vizsgálatát jelentette [121, 127, 222]. Munkánk nemzetközi ismertségét jelentősen növelte, és számos későbbi kooperáció kezdetét jelentette, hogy ebben az időszakban tagjai voltunk egy EU FP6 konzorciumnak (ATOM 3D).

A mikroeszközök alkalmazhatósága kiterjesztésének logikus következő lépése az volt, hogy a szakirodalomban már fellelhető módszereket a mikroeszközök felületének kezelésére adaptáltuk. Kooperációs munkákkal megmutattuk, hogy a szerkezeteket fehérjével való bevonással [150] egyedi sejtek manipulációjára alkalmas eszközzé [153], fém nanorészecskékkel történő bevonással pedig mobilis szenzorrá lehet alakítani [167, 177] mikrofluidikai környezetben. Nemzetközi kapcsolatainkat ebben az időszakban az EU egy COST és egy, a biológiai alkalmazásokat alapvetően szem előtt tartó olasz-japán-magyar ERA-NET programja biztosította, amely utóbbi keretében a szenzorikai alkalmazások [162] és egyedi sejtes vizsgálatára alkalmas mikrokörnyezet fejlesztése [179] került előtérbe

A felületkezelésén túl, az összetett mikroeszközök optikai csipesszel való manipulációjának alkalmazásában is az elsők között voltunk. Ez a kutatási irány a 2010-es évek elejétől fontos szerepet játszott [136, 201] és hozzájárult ahhoz, hogy egyedi sejtek karakterizálására [192, 197] és egyedi sejtek indirekt optikai manipulációjára [153, 161] alkalmas mikroeszközöket tudtunk készíteni az elmúlt évtizedben.

A mikroeszközök legutóbbi fejlesztési iránya a deformálható struktúrák lehetséges alkalmazásait vizsgálja. A részben szintén nemzetközi kooperáció keretében folyó kutatás keretében a deformálható szerkezetek tulajdonságait vizsgáltuk, és a polimer nanoszálak, a mikroeszközök kulcsfontosságú alkatrészei, jellemzését [220, 221] követően igyekszünk azokat mind szélesebb körben alkalmazni. Javasoltunk lehetséges alkalmazásokat mind passzív (nanoszálak fluktuációján alapuló mikro-viszkoziméter [223]), mind aktív (sejtmanipulátor

család [216]) módon használt eszközökre. A mikro-viszkoziméterre a szlovák együttműködő partnerünkkel benyújtottunk egy szlovák szabadalmat is.

Közeli és középtávú terveim között a következő kutatási irányok szerepelnek:

- Gyógyszer hatóanyagok sejtekbe való bejuttatását elősegítő anyagok és a sejtek közötti kapcsolat jellemzése felületkezelt, optikai csipesszel mozgatott, erőmérésre alkalmas mikroeszközökkel.
- Egyedi sejtek közötti kölcsönhatások vizsgálata rugalmas mikroeszközökkel.
- Mikrofluidikai rendszerekben a folyadék, illetve annak mozgásának jellemzésére alkalmas deformálható mikroeszközök fejlesztése.
- Rugalmas eszközökön alapuló, nagy áteresztőképességű, csiplaboratóriumi eszközökbe integrálható rendszerek fejlesztése egyedi sejtek vizsgálatára.

Köszönetnyilvánítás

A legfontosabb mindjárt az elején leszögezni, hogy a disszertációmban bemutatott tudományos eredmények, ahogy a tudományban legtöbbször, mind egy csapat erőfeszítésén alapulnak. Éppen ezért az összes munkatársamnak hálával tartozom, amiért segítségemre voltak ezeknek az eléréséhez. Természetesen munkám során mindig voltak kulcs személyek, akiknek a hozzájárulása kiemelkedő volt.

Legelsősorban kell köszönetet mondanom **Dr. Ormos Pálnak**, akinek köszönhetően ebbe a témába egyáltalán belefogtam, mint friss PhD fokozattal rendelkező kutató. Tapasztalata, az érdekes kutatási irányok iránti érzéke, a problémák nagyon tisztán való megfogalmazása és megközelítése mind-mind nagy segítség és példaértékű útmutatás volt számomra.

Nagyon hálás vagyok **Dr. Aihua Xie**-nek az Oklahomai Állami Egyetem fizika professzorának, aki ugyan nem a disszertációmban bemutatott témában támogatott, hanem „előző tudományos életem" során a fénnyel aktiválható fehérjék szerkezetének és működésének kutatásában, de akitől a tudományos szemlélethez, a kutatómunkához való általános hozzáálláshoz kaptam felbecsülhetetlen útravalót.

Közvetlen munkatársaim közül kutatómunkámat leginkább egykori PhD hallgatóim, későbbi kollégáim segítették, amiért nagyon sok köszönet jár nekik. **Badri L Aekbote**, **Vizsnyiczai Gaszton** és **Fekete Tamás** voltak azok, akikkel nap mint nap ötleteltünk, mértünk, újramértünk, kiértékeltünk, esetenként kezdtük elölről és a végén kéziratot írtunk.

Nem lenne tisztességes kihagyni a köszönetnyilvánításból a számos **BSc és MSc diákot**, akiknek az évek alatt témavezetője voltam, és akik fiatalos lendületükkel, sokszor újszerű megoldásaikkal lendítették előre a kutatómunkát, és akik a mindennapi labormunkát – az esetek nagy részében – nagy lelkesedéssel végezték.

Számos külföldi kooperációs partnerem közül ki kell emelnem **Bánó Gergelyt**, a kassai Pavol Jozef Šafárik egyetem tanszékvezető professzorát, akihez több, mint tíz éve köt inspiráló, folyton megújuló munkakapcsolat, és akinek a gazdag fantáziájának köszönhetünk sok szép közös munkát.

Hálával tartozom természetesen az SZBK Biofizikai Intézet jelenlegi és volt munkatársainak, amiért olyanok voltak velem – és remélhetőleg lesznek is még – amilyenek,

vagyis támogatók, segítőkészek, és akik miatt általában az Intézetben barátságos, családias munkahelyi hangulatban dolgozhatunk.

A legnagyobb köszönet természetesen családomat illeti. Az ő támogatásuk nélkül tényleg minden sokkal nehezebb lett volna. Zsófi, lévén maga is kutató, egyrészt átlátta és elfogadta a kutatóléttel kapcsolatos problémákat (ld. még: éjfélig a laborban), másrészt néha akaratlanul is, inspirációt tudott adni a munkához. És amikor úgy tűnt, hogy elfelejtettem, mindig ők emlékeztettek arra, hogy azért dolgozunk, hogy éljünk, és nem fordítva.

Irodalomjegyzék

1. Verma, G., K. Mondal, and A. Gupta, *Si-based MEMS resonant sensor: A review from microfabrication perspective.* Microelectronics Journal, 2021. **118**: p. 105210.
2. Mujtaba, J., et al., *Micro-Bio-Chemo-Mechanical-Systems: Micromotors, Microfluidics, and Nanozymes for Biomedical Applications.* Advanced Materials, 2021. **33**(22): p. 2007465.
3. Mohith, S., P.N. Karanth, and S.M. Kulkarni, *Recent trends in mechanical micropumps and their applications: A review.* Mechatronics, 2019. **60**: p. 34-55.
4. Wu, E.-S., et al., *Two-photon lithography for microelectronic application*. Microlithography '92. Vol. 1674. 1992: SPIE.
5. Maruo, S., O. Nakamura, and S. Kawata, *Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization.* Optics Letters, 1997. **22**(2): p. 132-134.
6. Galajda, P. and P. Ormos, *Complex micromachines produced and driven by light.* Applied Physics Letters, 2001. **78**(2): p. 249-251.
7. Formanek, F., et al., *Selective electroless plating to fabricate complex three-dimensional metallic micro/nanostructures.* Applied Physics Letters, 2006. **88**(8).
8. 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.
9. 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.
10. Cumpston, B.H., et al., *Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication.* Nature, 1999. **398**(6722): p. 51-54.
11. Ventelon, L., et al., *Optimization of quadrupolar chromophores for molecular two-photon absorption.* Synthetic Metals, 2002. **127**(1): p. 17-21.
12. Shukla, S., et al., *Two-Photon Lithography of Sub-Wavelength Metallic Structures in a Polymer Matrix.* Advanced Materials, 2010. **22**(33): p. 3695-3699.
13. Penmatsa, V., et al., *Fabrication of porous carbon micropillars using a block copolymer as porogen.* Carbon, 2010. **48**(14): p. 4109-4115.
14. Faraji Rad, Z., P.D. Prewett, and G.J. Davies, *High-resolution two-photon polymerization: the most versatile technique for the fabrication of microneedle arrays.* Microsystems & Nanoengineering, 2021. **7**(1): p. 71.
15. Huang, Z., et al., *Two-photon polymerization nanolithography technology for fabrication of stimulus-responsive micro/nano-structures for biomedical applications.* Nanotechnology Reviews, 2020. **9**(1): p. 1118-1136.
16. Liao, C., A. Wuethrich, and M. Trau, *A material odyssey for 3D nano/microstructures: two photon polymerization based nanolithography in bioapplications.* Applied Materials Today, 2020. **19**: p. 100635.
17. Nguyen, A.K. and R.J. Narayan, *Two-photon polymerization for biological applications.* Materials Today, 2017. **20**(6): p. 314-322.
18. Otuka, A.J.G., et al., *Two-Photon Polymerization: Functionalized Microstructures, Micro-Resonators, and Bio-Scaffolds.* Polymers, 2021. **13**(12): p. 1994.
19. Būtaitė, U.G., et al., *Indirect optical trapping using light driven micro-rotors for reconfigurable hydrodynamic manipulation.* Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 1215.

20. Phillips, D.B., et al., *Position clamping of optically trapped microscopic non-spherical probes.* Optics Express, 2011. **19**(21): p. 20622-20627.
21. Piqué, A., et al., *Laser 3D micro-manufacturing.* Journal of Physics D: Applied Physics, 2016. **49**(22): p. 223001.
22. Yang, T., et al., *An integrated optofluidic device for single-cell sorting driven by mechanical properties.* Lab on a Chip, 2015. **15**(5): p. 1262-1266.
23. Teh, K.S., *Additive direct-write microfabrication for MEMS: A review.* Frontiers of Mechanical Engineering, 2017. **12**(4): p. 490-509.
24. Sima, F., et al., *Three-dimensional femtosecond laser processing for lab-on-a-chip applications.* Nanophotonics, 2018. **7**(3): p. 613-634.
25. Maruo, S. and K. Ikuta, *Three-dimensional microfabrication by use of single-photon-absorbed polymerization.* Applied Physics Letters, 2000. **76**(19): p. 2656-2658.
26. Nguyen, D.T.T., et al., *One-step fabrication of submicrostructures by low one-photon absorption direct laser writing technique with local thermal effect.* Journal of Applied Physics, 2016. **119**(1).
27. Farsari, M., G. Filippidis, and C. Fotakis, *Fabrication of three-dimensional structures by three-photon polymerization.* Optics Letters, 2005. **30**(23): p. 3180-3182.
28. Manaka, T. and M. Iwamoto, *Preparation of Chiral Polydiacetylene Films by Using Three-Photon Polymerization.* J Nanosci Nanotechnol, 2016. **16**(4): p. 3394-7.
29. Xiong, W., et al., *Simultaneous additive and subtractive three-dimensional nanofabrication using integrated two-photon polymerization and multiphoton ablation.* Light: Science & Applications, 2012. **1**(4): p. e6-e6.
30. Croissant, J.G., et al., *Two-Photon-Excited Silica and Organosilica Nanoparticles for Spatiotemporal Cancer Treatment.* Advanced Healthcare Materials, 2018. **7**(7): p. 1701248.
31. Xu, C. and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm.* Journal of the Optical Society of America B, 1996. **13**(3): p. 481-491.
32. Lee, K.-S., et al., *Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated polymerization.* Progress in Polymer Science, 2008. **33**(6): p. 631-681.
33. Sun, H.B., et al., *Scaling laws of voxels in two-photon photopolymerization nanofabrication.* Applied Physics Letters, 2003. **83**(6): p. 1104-1106.
34. Sun, H.B., T. Tanaka, and S. Kawata, *Three-dimensional focal spots related to two-photon excitation.* Applied Physics Letters, 2002. **80**(20): p. 3673-3675.
35. 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.
36. Cao, H.-Z., et al., *Two-photon nanolithography of positive photoresist thin film with ultrafast laser direct writing.* Applied Physics Letters, 2013. **102**(20).
37. van der Velden, G., D. Fan, and U. Staufer, *Fabrication of a microfluidic device by using two-photon lithography on a positive photoresist.* Micro and Nano Engineering, 2020. **7**: p. 100054.
38. Zhou, W., et al., *An efficient two-photon-generated photoacid applied to positive-tone 3D microfabrication.* Science, 2002. **296**(5570): p. 1106-9.
39. Kawata, S., et al., *Finer features for functional microdevices - Micromachines can be created with higher resolution using two-photon absorption.* Nature, 2001. **412**(6848): p. 697-698.

40. Sun, H.-B. and S. Kawata, *Two-Photon Photopolymerization and 3D Lithographic Microfabrication*, in *NMR • 3D Analysis • Photopolymerization*, N. Fatkullin, et al., Editors. 2004, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 169-273.
41. Olziersky, A., et al., *Insight on the SU-8 resist as passivation layer for transparent Ga2O3–In2O3–ZnO thin-film transistors.* Journal of Applied Physics, 2010. **108**(6).
42. Chowdhury, Z.R. and R. Fedosejevs, *Two photon absorption coefficients and processing parameters for photoresists.* Microsystem Technologies, 2008. **14**(1): p. 59-67.
43. Haas, K.-H. and H. Wolter, *Synthesis, properties and applications of inorganic–organic copolymers (ORMOCER®s).* Current Opinion in Solid State and Materials Science, 1999. **4**(6): p. 571-580.
44. Klein, F., et al., *Elastic Fully Three-dimensional Microstructure Scaffolds for Cell Force Measurements.* Advanced Materials, 2010. **22**(8): p. 868-871.
45. Vizsnyiczai, G., L. Kelemen, and P. Ormos, *Holographic multi-focus 3D two-photon polymerization with real-time calculated holograms.* Optics Express, 2014. **22**(20): p. 24217-24223.
46. 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.
47. Albota, M., et al., *Design of Organic Molecules with Large Two-Photon Absorption Cross Sections.* Science, 1998. **281**(5383): p. 1653-1656.
48. Pitts, J.D., et al., *Submicron Multiphoton Free-Form Fabrication of Proteins and Polymers: Studies of Reaction Efficiencies and Applications in Sustained Release.* Macromolecules, 2000. **33**(5): p. 1514-1523.
49. Connell, J.L., et al., *Probing prokaryotic social behaviors with bacterial "lobster traps".* MBio, 2010. **1**(4): p. e00202-10.
50. Formanek, F., et al., *Three-dimensional fabrication of metallic nanostructures over large areas by two-photon polymerization.* Optics Express, 2006. **14**(2): p. 800-809.
51. Chatwin, C., et al., *UV microstereolithography system that uses spatial light modulator technology.* Applied Optics, 1998. **37**(32): p. 7514-7522.
52. Takahashi, H., et al., *Sparse-exposure technique in holographic two-photon polymerization.* Optics Express, 2008. **16**(21): p. 16592-16599.
53. Jenness, N.J., et al., *Three-dimensional parallel holographic micropatterning using a spatial light modulator.* Optics Express, 2008. **16**(20): p. 15942-15948.
54. Sun, H.-B., et al., *Real three-dimensional microstructures fabricated by photopolymerization of resins through two-photon absorption.* Optics Letters, 2000. **25**(15): p. 1110-1112.
55. Gvindzhiliia, G., et al., *Low-Fluorescence Starter for Optical 3D Lithography of Sub-40 nm Structures.* ACS Applied Optical Materials, 2023. **1**(5): p. 945-951.
56. Fischer, J. and M. Wegener, *Three-dimensional optical laser lithography beyond the diffraction limit.* Laser & Photonics Reviews, 2013. **7**(1): p. 22-44.
57. Wollhofen, R., et al., *120 nm resolution and 55 nm structure size in STED-lithography.* Optics Express, 2013. **21**(9): p. 10831-10840.
58. Obata, K., et al., *High-aspect 3D two-photon polymerization structuring with widened objective working range (WOW-2PP).* Light Sci Appl, 2013. **2**: p. e116.
59. Im, J., et al., *Strategies for Integrating Metal Nanoparticles with Two-Photon Polymerization Process: Toward High Resolution Functional Additive Manufacturing.* Advanced Functional Materials, 2023. **33**(39): p. 2211920.

60. Maruo, S. and T. Saeki, *Femtosecond laser direct writing of metallic microstructures by photoreduction of silver nitrate in a polymer matrix.* Optics Express, 2008. **16**(2): p. 1174-1179.
61. Carlotti, M. and V. Mattoli, *Functional Materials for Two-Photon Polymerization in Microfabrication.* Small, 2019. **15**(40): p. 1902687.
62. Staudinger, U., et al., *Development of electrically conductive microstructures based on polymer/CNT nanocomposites via two-photon polymerization.* Microelectronic Engineering, 2017. **179**: p. 48-55.
63. Ushiba, S., et al., *3D microfabrication of single-wall carbon nanotube/polymer composites by two-photon polymerization lithography.* Carbon, 2013. **59**: p. 283-288.
64. Song, J., et al., *From Simple to Architecturally Complex Hydrogel Scaffolds for Cell and Tissue Engineering Applications: Opportunities Presented by Two-Photon Polymerization.* Advanced Healthcare Materials, 2020. **9**(1): p. 1901217.
65. Torgersen, J., et al., *Hydrogels for Two-Photon Polymerization: A Toolbox for Mimicking the Extracellular Matrix.* Advanced Functional Materials, 2013. **23**(36): p. 4542-4554.
66. Hahn, V., et al., *Two-step absorption instead of two-photon absorption in 3D nanoprinting.* Nature Photonics, 2021. **15**(12): p. 932-938.
67. Tseng, F.-G., et al., *A surface-tension-driven fluidic network for precise enzyme batch-dispensing and glucose detection.* Sensors and Actuators A: Physical, 2004. **111**(1): p. 107-117.
68. Joshi, M., et al., *Silanization and antibody immobilization on SU-8.* Applied Surface Science, 2007. **253**(6): p. 3127-3132.
69. Tao, S.L., K. Popat, and T.A. Desai, *Off-wafer fabrication and surface modification of asymmetric 3D SU-8 microparticles.* Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 3153-8.
70. Iranpoor, N. and P. Salehi, *Ceric ammonium nitrate: A mild and efficient reagent for conversion of epoxides to β-nitrato alcohols.* Tetrahedron, 1995. **51**(3): p. 909-912.
71. Wang, Y., et al., *Surface graft polymerization of SU-8 for bio-MEMS applications.* Journal of Micromechanics and Microengineering, 2007. **17**(7): p. 1371.
72. Wu, C., M.-H. Chen, and F.-G. Tseng. *SU-8 Hydrophilic Modification by Forming Copolyrner with Hydrophilic Epoxy Molecule*. 2003.
73. Dai, W. and W. Wang, *Selective metallization of cured SU-8 microstructures using electroless plating method.* Sensors and Actuators A: Physical, 2007. **135**(1): p. 300-307.
74. Farrer, R.A., et al., *Selective Functionalization of 3-D Polymer Microstructures.* Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(6): p. 1796-1797.
75. Cavalli, G., et al., *Multistep Synthesis on SU-8: Combining Microfabrication and Solid-Phase Chemistry on a Single Material.* Journal of Combinatorial Chemistry, 2007. **9**(3): p. 462-472.
76. Chatterjee, S., et al., *Polyallylamine as an Adhesion Promoter for SU-8 Photoresist.* Microscopy and Microanalysis, 2016. **22**(5): p. 964-970.
77. Park, J.-H., et al., *Simply Modified Biosensor for the Detection of Human IgG Based on Protein AModified Porous Silicon Interferometer.* Bulletin of the Korean Chemical Society, 2009. **30**(7): p. 1593-1597.
78. Yeh, P.Y., et al., *Nonfouling Hydrophilic Poly(ethylene glycol) Engraftment Strategy for PDMS/SU-8 Heterogeneous Microfluidic Devices.* Langmuir, 2012. **28**(46): p. 16227-16236.

79. Bunea, A.-I., et al., *Light-Powered Microrobots: Challenges and Opportunities for Hard and Soft Responsive Microswimmers.* Advanced Intelligent Systems, 2021. **3**(4): p. 2000256.
80. Koleoso, M., et al., *Micro/nanoscale magnetic robots for biomedical applications.* Materials Today Bio, 2020. **8**: p. 100085.
81. Kaynak, M., et al., *Acoustofluidic actuation of in situ fabricated microrotors.* Lab on a Chip, 2016. **16**(18): p. 3532-3537.
82. Rao, K.J., et al., *A Force to Be Reckoned With: A Review of Synthetic Microswimmers Powered by Ultrasound.* Small, 2015. **11**(24): p. 2836-2846.
83. Bente, K., et al., *Biohybrid and Bioinspired Magnetic Microswimmers.* Small, 2018. **14**(29): p. 1704374.
84. Ceylan, H., et al., *3D-Printed Biodegradable Microswimmer for Theranostic Cargo Delivery and Release.* ACS Nano, 2019. **13**(3): p. 3353-3362.
85. Xu, H., et al., *3D nanofabricated soft microrobots with super-compliant picoforce springs as onboard sensors and actuators.* Nature Nanotechnology, 2024. **19**(4): p. 494-503.
86. Maruo, S., A. Takaura, and Y. Saito, *Optically driven micropump with a twin spiral microrotor.* Optics Express, 2009. **17**(21): p. 18525-18532.
87. Phillips, D.B., et al., *An optically actuated surface scanning probe.* Optics Express, 2012. **20**(28): p. 29679-29693.
88. Simpson, S.H. and S. Hanna, *Thermal motion of a holographically trapped SPM-like probe.* Nanotechnology, 2009. **20**(39).
89. Ashkin, A., *Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure.* Physical Review Letters, 1970. **24**(4): p. 156-159.
90. Neuman, K.C. and S.M. Block, *Optical trapping.* Review of Scientific Instruments, 2004. **75**(9): p. 2787-2809.
91. Jonas, A. and P. Zemanek, *Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis.* Electrophoresis, 2008. **29**(24): p. 4813-4851.
92. Ashkin, A., et al., *Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles.* Optics Letters, 1986. **11**(5): p. 288-290.
93. Ashkin, A., *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime.* Biophysical Journal, 1992. **61**(2): p. 569-582.
94. Mazolli, A., P.A.M. Neto, and H.M. Nussenzveig, *Theory of Trapping Forces in Optical Tweezers.* Proceedings: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2003. **459**(2040): p. 3021-3041.
95. 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.
96. Deubel, M., et al., *Direct laser writing of three-dimensional photonic-crystal templates for telecommunications.* Nature Materials, 2004. **3**(7): p. 444-447.
97. Li, Y., et al., *High-contrast infrared polymer photonic crystals fabricated by direct laser writing.* Optics Letters, 2018. **43**(19): p. 4711-4714.
98. Ovsianikov, A., et al., *Ultra-Low Shrinkage Hybrid Photosensitive Material for Two-Photon Polymerization Microfabrication.* ACS Nano, 2008. **2**(11): p. 2257-2262.
99. Campbell, M., et al., *Fabrication of photonic crystals for the visible spectrum by holographic lithography.* Nature, 2000. **404**(6773): p. 53-56.
100. Kondo, T., et al., *Holographic lithography of periodic two- and three-dimensional microstructures in photoresist SU-8.* Optics Express, 2006. **14**(17): p. 7943-7953.

101. Fischer, J. and M. Wegener, *Three-dimensional direct laser writing inspired by stimulated-emission-depletion microscopy [Invited].* Optical Materials Express, 2011. **1**(4): p. 614-624.
102. 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.
103. Buchroithner, B., et al., *Dual Channel Microfluidics for Mimicking the Blood–Brain Barrier.* ACS Nano, 2021. **15**(2): p. 2984-2993.
104. Maruo, S. and H. Inoue, *Optically driven micropump produced by three-dimensional two-photon microfabrication.* Applied Physics Letters, 2006. **89**(14): p. 144101.
105. Villangca, M.J., et al., *Light-driven micro-tool equipped with a syringe function.* Light-Science & Applications, 2016. **5**: p. e16148.
106. Gerena, E., et al., *Tele–Robotic Platform for Dexterous Optical Single-Cell Manipulation.* Micromachines, 2019. **10**(10): p. 677.
107. Shishkin, I., et al., *Auxiliary Optomechanical Tools for 3D Cell Manipulation.* Micromachines, 2020. **11**(1): p. 90.
108. 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.
109. Di Leonardo, R., F. Ianni, and G. Ruocco, *Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays.* Optics Express, 2007. **15**(4): p. 1913-1922.
110. Liu, T., et al., *Ultrahigh-printing-speed photoresists for additive manufacturing.* Nature Nanotechnology, 2024. **19**(1): p. 51-57.
111. Zhang, S., et al., *Ultrafast, high-resolution and large-size three-dimensional structure manufacturing through high-efficiency two-photon polymerization initiators.* Additive Manufacturing, 2021. **47**: p. 102358.
112. Jesacher, A. and M.J. Booth, *Parallel direct laser writing in three dimensions with spatially dependent aberration correction.* Optics Express, 2010. **18**(20): p. 21090-21099.
113. Horváth, B., P. Ormos, and L. Kelemen, *Nearly Aberration-Free Multiphoton Polymerization into Thick Photoresist Layers.* Micromachines, 2017. **8**(7): p. 219.
114. Perrucci, F., et al., *Optimization of a suspended two photon polymerized microfluidic filtration system.* Microelectronic Engineering, 2018. **195**: p. 95-100.
115. Wang, C., et al., *Magnetically driven rotary microfilter fabricated by two-photon polymerization for multimode filtering of particles.* Optics Letters, 2021. **46**(12): p. 2968-2971.
116. Erfle, P., et al., *Goodbye fouling: a unique coaxial lamination mixer (CLM) enabled by two-photon polymerization for the stable production of monodisperse drug carrier nanoparticles.* Lab on a Chip, 2021. **21**(11): p. 2178-2193.
117. Fakeih, E., et al., *Fabrication and Characterization of Porous Microneedles for Enhanced Fluid Injection and Suction: A Two-Photon Polymerization Approach.* Advanced Engineering Materials, 2023. **25**(16): p. 2300161.
118. Oellers, M., F. Lucklum, and M.J. Vellekoop, *On-chip mixing of liquids with swap structures written by two-photon polymerization.* Microfluidics and Nanofluidics, 2019. **24**(1): p. 4.
119. Medina-Sánchez, M., et al., *Cellular Cargo Delivery: Toward Assisted Fertilization by Sperm-Carrying Micromotors.* Nano Letters, 2016. **16**(1): p. 555-561.
120. Sakar, M.S., et al., *Single cell manipulation using ferromagnetic composite microtransporters.* Applied Physics Letters, 2010. **96**(4).
121. Kelemen, L., S. Valkai, and P. Ormos, *Integrated optical motor.* Applied Optics, 2006. **45**(12): p. 2777-2780.

122. Metzger, N.K., et al., *Observation and simulation of an optically driven micromotor.* Journal of Optics, 2011. **13**(4): p. 044018.
123. Palima, D., et al., *Optical forces through guided light deflections.* Optics Express, 2013. **21**(1): p. 581-593.
124. Howse, J.R., et al., *Self-Motile Colloidal Particles: From Directed Propulsion to Random Walk.* Physical Review Letters, 2007. **99**(4): p. 048102.
125. Jiang, H.R., N. Yoshinaga, and M. Sano, *Active Motion of a Janus Particle by Self-Thermophoresis in a Defocused Laser Beam.* Physical Review Letters, 2010. **105**(26).
126. Paxton, W.F., et al., *Catalytic nanomotors: Autonomous movement of striped nanorods.* Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(41): p. 13424-13431.
127. Búzás, A., et al., *Light sailboats: Laser driven autonomous microrobots.* Applied Physics Letters, 2012. **101**(4): p. 041111.
128. Oroszi, L., et al., *Dimensionality constraints of light-induced rotation.* Applied Physics Letters, 2015. **107**(20): p. 204106.
129. Svoboda, K., et al., *Direct Observation of Kinesin Stepping by Optical Trapping Interferometry.* Nature, 1993. **365**(6448): p. 721-727.
130. Vizsnyiczai, G., et al., *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.
131. Otte, E. and C. Denz, *Optical trapping gets structure: Structured light for advanced optical manipulation.* Applied Physics Reviews, 2020. **7**(4).
132. Agarwal, R., et al., *Manipulation and assembly of nanowires with holographic optical traps.* Optics Express, 2005. **13**(22): p. 8906-8912.
133. Ghadiri, R., et al., *Microassembly of complex and three-dimensional microstructures using holographic optical tweezers.* Journal of Micromechanics and Microengineering, 2012. **22**(6): p. 065016.
134. Köhler, J., et al., *Optical screw-wrench for microassembly.* Microsystems & Nanoengineering, 2017. **3**(1): p. 16083.
135. Rodrigo, P.J., et al., *2D optical manipulation and assembly of shape complementary planar microstructures.* Optics Express, 2007. **15**(14): p. 9009-9014.
136. Rodrigo, P.J., et al., *Optical microassembly platform for constructing reconfigurable microenvironments for biomedical studies.* Optics Express, 2009. **17**(8): p. 6578-6583.
137. Tottori, S., et al., *Magnetic Helical Micromachines: Fabrication, Controlled Swimming, and Cargo Transport.* Advanced Materials, 2012. **24**(6): p. 811-816.
138. Baldock, S.J., et al., *Single-cell Raman microscopy of microengineered cell scaffolds.* Journal of Raman Spectroscopy, 2019. **50**(3): p. 371-379.
139. Marie, R., et al., *Immobilisation of DNA to polymerised SU-8 photoresist.* Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(7): p. 1327-1332.
140. Wolfesberger, C., et al., *Streptavidin functionalized polymer nanodots fabricated by visible light lithography.* Journal of Nanobiotechnology, 2015. **13**(1): p. 27.
141. Xin, Y., et al., *Surface Functionalization of SU-8 Vertical Waveguide for Biomedical Sensing: Bacteria Diagnosis.* Proceedings, 2018. **2**(13): p. 1081.
142. Chen, Y.-S., et al., *Fabrication and Characterization of Three-Dimensional Silver-Coated Polymeric Microstructures.* Advanced Functional Materials, 2006. **16**(13): p. 1739-1744.
143. Chen, Y.-S., A. Tal, and S.M. Kuebler, *Route to Three-Dimensional Metallized Microstructures Using Cross-Linkable Epoxide SU-8.* Chemistry of Materials, 2007. **19**(16): p. 3858-3860.

144. Tao, S.L., et al., *Surface Modification of SU-8 for Enhanced Biofunctionality and Nonfouling Properties.* Langmuir, 2008. **24**(6): p. 2631-2636.
145. Richter, B., et al., *Guiding Cell Attachment in 3D Microscaffolds Selectively Functionalized with Two Distinct Adhesion Proteins.* Advanced Materials, 2017. **29**(5): p. 1604342.
146. Dundas, C.M., D. Demonte, and S. Park, *Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2013. **97**(21): p. 9343-9353.
147. Salva, M.L., et al., *Methods for immobilizing receptors in microfluidic devices: A review.* Micro and Nano Engineering, 2021. **11**: p. 100085.
148. Wong, J., A. Chilkoti, and V.T. Moy, *Direct force measurements of the streptavidin–biotin interaction.* Biomolecular Engineering, 1999. **16**(1): p. 45-55.
149. Sedlak, S.M., et al., *Streptavidin/biotin: Tethering geometry defines unbinding mechanics.* Science Advances, 2020. **6**(13): p. eaay5999.
150. Aekbote, B.L., et al., *Aminosilane-based functionalization of two-photon polymerized 3D SU-8 microstructures.* European Polymer Journal, 2012. **48**(10): p. 1745-1754.
151. Balint, S., et al., *Simple Route for Preparing Optically Trappable Probes for Surface-Enhanced Raman Scattering.* Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(41): p. 17724-17729.
152. Hesse, J., et al., *Single-Molecule Reader for High-Throughput Bioanalysis.* Analytical Chemistry, 2004. **76**(19): p. 5960-5964.
153. Aekbote, B.L., et al., *Surface-modified complex SU-8 microstructures for indirect optical manipulation of single cells.* Biomedical Optics Express, 2016. **7**(1): p. 45-56.
154. Schlapak, R., et al., *Glass Surfaces Grafted with High-Density Poly(ethylene glycol) as Substrates for DNA Oligonucleotide Microarrays.* Langmuir, 2006. **22**(1): p. 277-285.
155. Ashkin, A. and J.M. Dziedzic, *Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria.* Science, 1987. **235**(4795): p. 1517-1520.
156. Konig, K., et al., *Cell damage in near-infrared multimode optical traps as a result of multiphoton absorption.* Optics Letters, 1996. **21**(14): p. 1090-1092.
157. Leitz, G., et al., *Stress response in Caenorhabditis elegans caused by optical tweezers: Wavelength, power, and time dependence.* Biophysical Journal, 2002. **82**(4): p. 2224-2231.
158. Rasmussen, M.B., L.B. Oddershede, and H. Siegumfeldt, *Optical tweezers cause physiological damage to Escherichia coli and Listeria bacteria.* Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(8): p. 2441-2446.
159. Habaza, M., et al., *Rapid 3D Refractive-Index Imaging of Live Cells in Suspension without Labeling Using Dielectrophoretic Cell Rotation.* Advanced Science, 2017. **4**(2): p. 1600205.
160. Dao, M., C.T. Lim, and S. Suresh, *Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers.* Journal of the Mechanics and Physics of Solids, 2003. **51**(11-12): p. 2259-2280.
161. Vizsnyiczai, G., et al., *Multiview microscopy of single cells through microstructure-based indirect optical manipulation.* Biomedical Optics Express, 2020. **11**(2): p. 945-962.
162. Kelemen, L., et al., *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.
163. Schunk, G., et al., *Identifying modes of large whispering-gallery mode resonators from the spectrum and emission pattern.* Optics Express, 2014. **22**(25): p. 30795-30806.

164. Wu, J., et al., *Rapid 3D μ-printing of polymer optical whispering-gallery mode resonators.* Opt Express, 2015. **23**(23): p. 29708-14.
165. White, I.M. and X. Fan, *On the performance quantification of resonant refractive index sensors.* Optics Express, 2008. **16**(2): p. 1020-1028.
166. Lakowicz, J.R., *Plasmonics in Biology and Plasmon-Controlled Fluorescence.* Plasmonics, 2006. **1**(1): p. 5-33.
167. Aekbote, B.L., et al., *Gold nanoparticle-mediated fluorescence enhancement by two-photon polymerized 3D microstructures.* Optical Materials, 2014. **38**: p. 301-309.
168. Hong, G., et al., *Near-Infrared-Fluorescence-Enhanced Molecular Imaging of Live Cells on Gold Substrates.* Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(20): p. 4644-4648.
169. Matveeva, E.G., et al., *Metal particle-enhanced fluorescent immunoassays on metal mirrors.* Analytical Biochemistry, 2007. **363**(2): p. 239-245.
170. Ben Haddada, M., et al., *Optimizing the immobilization of gold nanoparticles on functionalized silicon surfaces: amine- vs thiol-terminated silane.* Gold Bulletin, 2013. **46**(4): p. 335-341.
171. Bharadwaj, P. and L. Novotny, *Spectral dependence of single molecule fluorescence enhancement.* Optics Express, 2007. **15**(21): p. 14266-14274.
172. Malicka, J., et al., *Effects of fluorophore-to-silver distance on the emission of cyanine–dye-labeled oligonucleotides.* Analytical Biochemistry, 2003. **315**(1): p. 57-66.
173. Choumane, H., et al., *Double interference fluorescence enhancement from reflective slides: Application to bicolor microarrays.* Applied Physics Letters, 2005. **87**(3).
174. Moal, E.L., et al., *Enhanced Fluorescence Cell Imaging with Metal-Coated Slides.* Biophysical Journal, 2007. **92**(6): p. 2150-2161.
175. Li, M., et al., *Shape-dependent surface-enhanced Raman scattering in gold–Raman-probe–silica sandwiched nanoparticles for biocompatible applications.* Nanotechnology, 2012. **23**(11): p. 115501.
176. Makiabadi, T., et al., *Preparation, Optimization, and Characterization of SERS Sensor Substrates Based on Two-Dimensional Structures of Gold Colloid.* Plasmonics, 2010. **5**(1): p. 21-29.
177. Vizsnyiczai, G., et al., *Optically Trapped Surface-Enhanced Raman Probes Prepared by Silver Photoreduction to 3D Microstructures.* Langmuir, 2015. **31**(36): p. 10087-10093.
178. Bashir, F., et al., *Viable protoplast formation of the coral endosymbiont alga Symbiodinium spp. in a microfluidics platform.* Lab on a Chip, 2022. **22**(16): p. 2986-2999.
179. Sima, F., et al., *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.
180. Denais, C.M., et al., *Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration.* Science, 2016. **352**(6283): p. 353-358.
181. Hu, S., et al., *Translational and rotational manipulation of filamentous cells using optically driven microrobots.* Optics Express, 2019. **27**(12): p. 16475-16482.
182. Hu, S., et al., *Automated Indirect Transportation of Biological Cells with Optical Tweezers and a 3D Printed Microtool.* Applied Sciences, 2019. **9**(14): p. 2883.
183. Mori, S., et al., *Optically driven microtools with an antibody-immobilised surface for on-site cell assembly.* IET Nanobiotechnology, 2023. **17**(3): p. 197-203.

184. Hayakawa, T., S. Fukada, and F. Arai, *Fabrication of an On-Chip Nanorobot Integrating Functional Nanomaterials for Single-Cell Punctures.* IEEE Transactions on Robotics, 2014. **30**(1): p. 59-67.
185. Srivastava, S.K., et al., *Medibots: Dual-Action Biogenic Microdaggers for Single-Cell Surgery and Drug Release.* Advanced Materials, 2016. **28**(5): p. 832-837.
186. Ohashi, T., et al., *Experimental and numerical analyses of local mechanical properties measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells.* Bio-Medical Materials and Engineering, 2002. **12**: p. 319-327.
187. Pesen, D. and J.H. Hoh, *Micromechanical Architecture of the Endothelial Cell Cortex.* Biophysical Journal, 2005. **88**(1): p. 670-679.
188. Vargas-Pinto, R., et al., *The Effect of the Endothelial Cell Cortex on Atomic Force Microscopy Measurements.* Biophysical Journal, 2013. **105**(2): p. 300-309.
189. Dy, M.C., S. Kanaya, and T. Sugiura, *Localized cell stiffness measurement using axial movement of an optically trapped microparticle.* Journal of Biomedical Optics, 2013. **18**(11).
190. Nawaz, S., et al., *Cell Visco-Elasticity Measured with AFM and Optical Trapping at Sub-Micrometer Deformations.* Plos One, 2012. **7**(9): p. e45297.
191. Yousafzai, M.S., et al., *Effect of neighboring cells on cell stiffness measured by optical tweezers indentation.* J Biomed Opt, 2016. **21**(5): p. 57004.
192. Grexa, I., et al., *Single-Cell Elasticity Measurement with an Optically Actuated Microrobot.* Micromachines, 2020. **11**(9): p. 882.
193. Feneberg, W., M. Aepfelbacher, and E. Sackmann, *Microviscoelasticity of the Apical Cell Surface of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) within Confluent Monolayers.* Biophysical Journal, 2004. **87**(2): p. 1338-1350.
194. Mathur, A.B., et al., *Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy.* Journal of Biomechanics, 2001. **34**(12): p. 1545-1553.
195. Chiou, Y.W., et al., *The Influence of Physical and Physiological Cues on Atomic Force Microscopy-Based Cell Stiffness Assessment.* Plos One, 2013. **8**(10).
196. Harris, A.R. and G.T. Charras, *Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements.* Nanotechnology, 2011. **22**(34): p. 345102.
197. Fekete, T., et al., *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.
198. Mészáros, M., et al., *Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **123**: p. 228-240.
199. Inomata, N., et al., *Omnidirectional Actuation of Magnetically Driven Microtool for Cutting of Oocyte in a Chip.* Journal of Microelectromechanical Systems, 2011. **20**(2): p. 383-388.
200. Malachowski, K., et al., *Self-Folding Single Cell Grippers.* Nano Letters, 2014. **14**(7): p. 4164-4170.
201. Palima, D., et al., *Wave-guided optical waveguides.* Optics Express, 2012. **20**(3): p. 2004-2014.
202. Kolb, T., et al., *Optofluidic rotation of living cells for single-cell tomography.* J Biophotonics, 2015. **8**(3): p. 239-46.
203. Kelbauskas, L., et al., *Optical computed tomography for spatially isotropic four-dimensional imaging of live single cells.* Science Advances, 2017. **3**(12): p. e1602580.

204. Fritzsche, M., et al., *Cytoskeletal actin dynamics shape a ramifying actin network underpinning immunological synapse formation.* Science Advances, 2017. **3**(6): p. e1603032.
205. Hell, S. and E.H.K. Stelzer, *Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation.* Optics Communications, 1992. **93**(5): p. 277-282.
206. Huisken, J., et al., *Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy.* Science, 2004. **305**(5686): p. 1007-1009.
207. Krzic, U., et al., *Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging.* Nature Methods, 2012. **9**: p. 730.
208. Shaw, P.J., et al., *Tilted View Reconstruction in Optical Microscopy - 3-Dimensional Reconstruction of Drosophila-Melanogaster Embryo Nuclei.* Biophysical Journal, 1989. **55**(1): p. 101-110.
209. Wu, Y., et al., *Multiview confocal super-resolution microscopy.* Nature, 2021. **600**(7888): p. 279-284.
210. Yang, B., et al., *DaXi-high-resolution, large imaging volume and multi-view single-objective light-sheet microscopy.* Nat Methods, 2022. **19**(4): p. 461-469.
211. Swoger, J., J. Huisken, and E.H. Stelzer, *Multiple imaging axis microscopy improves resolution for thick-sample applications.* Opt Lett, 2003. **28**(18): p. 1654-6.
212. Wu, Y., et al., *Spatially isotropic four-dimensional imaging with dual-view plane illumination microscopy.* Nature Biotechnology, 2013. **31**(11): p. 1032-1038.
213. Staier, F., et al., *Micro axial tomography: A miniaturized, versatile stage device to overcome resolution anisotropy in fluorescence light microscopy.* Review of Scientific Instruments, 2011. **82**(9).
214. Ahmed, D., et al., *Rotational manipulation of single cells and organisms using acoustic waves.* Nature Communications, 2016. **7**(1): p. 11085.
215. Wolfson, D., et al., *Rapid 3D fluorescence imaging of individual optically trapped living immune cells.* Journal of Biophotonics, 2015. **8**(3): p. 208-216.
216. Iványi, G.T., et al., *Optically Actuated Soft Microrobot Family for Single-Cell Manipulation.* Advanced Materials, 2024. **36**(32): p. 2401115.
217. Salánki, R., et al., *Single Cell Adhesion Assay Using Computer Controlled Micropipette.* PLOS ONE, 2014. **9**(10): p. e111450.
218. Jager, E.W.H., O. Inganäs, and I. Lundström, *Microrobots for Micrometer-Size Objects in Aqueous Media: Potential Tools for Single-Cell Manipulation.* Science, 2000. **288**(5475): p. 2335-2338.
219. Jin, Q., et al., *Untethered Single Cell Grippers for Active Biopsy.* Nano Letters, 2020. **20**(7): p. 5383-5390.
220. Kubacková, J., et al., *Bending dynamics of viscoelastic photopolymer nanowires.* Applied Physics Letters, 2020. **117**(1).
221. Kubacková, J., et al., *Assessing the Viscoelasticity of Photopolymer Nanowires Using a Three-Parameter Solid Model for Bending Recovery Motion.* Nanomaterials, 2021. **11**(11): p. 2961.
222. Di Leonardo, R., et al., *Hydrodynamic Synchronization of Light Driven Microrotors.* Physical Review Letters, 2012. **109**(3).
223. Vizsnyiczai, G., et al., *3D-printed ultra-small Brownian viscometers.* Scientific Reports, 2024. **14**(1): p. 13964.