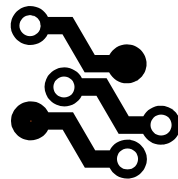




M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar



BMEETT

ELEKTRONIKAI TECHNOLÓGIA TANSZÉK

Pap Norbert^{1,2}

FluidFM konzolok rugóállandójának meghatározása szimulációs és kísérleti módszerekkel

TDK Dolgozat

Konzulensek

Dr. Bonyár Attila¹

Nagy Ágoston Gábor^{1,2}

Dr. Hajnal Zoltán²

Dr. Horváth Róbert²

¹BME VIK ETT

²MTA EK MFA, Nanobioszenzorika Lendület kutatócsoport

Budapest, 2019. október

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Bevezetés	6
1.1.	Témafelvetés	6
2.	Szakirodalmi áttekintés	8
2.1.	Atomerő-mikroszkóp	8
2.2.	Fluidikai atomerő-mikroszkóp felépítése	10
2.3.	FluidFM konzolok felépítése	12
2.4.	FluidFM konzolok optikai érzékenysége és rugóállandója	13
2.5.	A Sader-módszer	16
2.6.	A Payam és munkatársai által kidolgozott módszer	17
3.	Kísérleti eszközök és módszerek	20
3.1.	Comsol Multiphysics 5.3a	20
3.2.	Acoustic-Solid Interaction modell	20
3.3.	Sejtadhézió mérés FluidFM BOT-tal	21
4.	Eredmények és értékelésük	23
4.1.	FluidFM konzol modelljének megalkotás	23
4.1.1.	Konzol mikroszkópos vizsgálata	24
4.1.2.	Comsol CAD modell	25
4.2.	Szimulációs eredmények	26
4.2.1.	Mesh konvergencia a frekvenciák szempontjából	27
4.2.2.	Apertúra függése a frekvenciák szempontjából	30
4.2.3.	Anyagparaméter a frekvenciák szempontjából	30
4.2.4.	A konzol körülvevő viszkózus közeg vizsgálata	32
4.3.	Konzolok rezonanciafrekvenciáinak méréssel történő meghatározása	33
4.3.1.	FluidFM-mel mért rezonanciafrekvenciák	33

4.3.2.	VEECO AFM-mel mért rezonanciafrekvenciák	37
4.4.	Hidrodinamikai függvény	38
4.5.	A két módszer összehasonlítása	41
4.6.	A Payam-módszer alkalmazhatóságának további tesztelése	42
5.	Összefoglalás	44
6.	Köszönetnyilvánítás	45
7.	Irodalomjegyzék	46

KIVONAT

A nanofluidikai atomerő-mikroszkóp (FluidFM) a hagyományos atomerő-mikroszkóp (AFM), és nanofluidikai csatornák kombinációja. A FluidFM többek között sejtbiológia kutatásokra, pl. egyedi sejtek morfológiájának, mechanikai tulajdonságainak, metabolizmusának vagy adhéziójának vizsgálatára használható.

A FluidFM konzolok geometriája eltér a hagyományos AFM konzoloktól. A szilícium-nitrid alapú konzolban található fluidikai csatornát pillérek támasztják alá, így növelve a stabilitást, valamint a konzol végén különböző kimeneti apertúrák találhatóak. Sejtadhézió mérésére első sorban a FluidFM mikro-pipetta konzoljai alkalmasak, melyek kivezető nyílása 2, 4 vagy 8 μm átmérőjű lehet. Sejtadhéziós erőspektroszkópiához a Hooke-törvényt használjuk, melynek megoldása adja a sejtek kitapadásának Newtonban kifejezett értékét. Ehhez elengedhetetlen a konzol deformációs képességének és rugóállandójának precíz meghatározása. Tömör, téglatest alakú konzolok és eddig a FluidFM konzolok rugóállandójának meghatározásához használt Sader-módszer a termikus zajspektrumból számított jósági tényezőt és a konzol rezonanciafrekvenciáit használja. Mivel a módszer rendkívül érzékeny a külső zajokra, így nem csak a FluidFM konzolok rugóállandója, hanem a FluidFM-mel végzett sejtadhézió mérések szórása is nagymértékben megnőhet, ami számos kérdést felvet a Sader-módszer alkalmazhatóságát illetően FluidFM konzolok esetében.

Munkám célja egy alternatív, Payam és mtsi. által kidolgozott módszer alkalmazhatóságának tesztelése FluidFM konzolok rugóállandójának pontosabb kalibrálására. A módszer eliminálja a jósági tényezőt, azonban használja a konzol 1. és 2. rezonanciafrekvenciáját levegőben és viszkózus közegben mérve. Ezek közül a 2. rezonanciafrekvenciákat a műszer nem tudja közvetlenül mérni. A céloom ezért modellezés, numerikus szimuláció és alternatív kísérleti módszerek segítségével a FluidFM konzolok hidrodinamikai viselkedésének leírása, amely segítségével lehetővé válik a konzolok rugóállandójának megbízható kalibrálása.

ABSTRACT

The nanofluidic atomic-force microscope (FluidFM) is the combination of the conventional atomic-force microscope (AFM) and nanofluidic channels. FluidFM can be used in research areas connected to biology, such as the investigation of individual cell's morphology, mechanical properties, metabolism, or even to measure cell-adhesion.

The geometry of FluidFM cantilevers differ from the conventional ones used in AFM. The channel inside the silicon-nitride cantilever is stabilized by pillars, and an aperture with different diameters is located at the end. For cell-adhesion measurement FluidFM micropipet cantilevers are used, which have 2, 4 or 8 μm apertures. Single-cell force spectroscopy is based on Hooke's law, its solution gives the numerical value of cell adhesion in the form of adhesion force. The precise determination of the optical lever sensitivity and the spring constant is crucial for reliable force-spectroscopy measurements. The current software of FluidFM uses Sader's method to determine the spring constant. This method was originally established for rectangular, solid AFM cantilevers and uses the peak position and quality factor of the cantilever's fundamental resonance peak, derived from its thermal-noise spectrum. The method is very sensitive for external noises and through an inaccurate spring constant calibration it is possible to introduce serious deviation in the obtained force-spectroscopy and cell adhesion measurements as well. This raises questions about the applicability of Sader's method for this purpose.

The goal of my work is to investigate the feasibility of a new method introduced by Payam et. al, for the calibration of FluidFM cantilevers. This method eliminates the quality factor, however, uses the cantilever's 1st and 2nd resonant frequencies in air and in an arbitrary viscous medium (e.g. water). The 2nd resonant frequency cannot be directly measured by the instrument. Thus my aim is to investigate the hydrodynamic behavior of the FluidFM cantilevers through modeling/simulation and also experimental methods in order to find a more reliable solution for the calibration of their spring constant.

1. BEVEZETÉS

Többsejtű szervezetekben a sejtek adott funkcióra specializált szöveteket alkotnak. A szigorúan rendezett szöveti struktúra fenntartásán elengedhetetlen a sejtek egymáshoz és az extracelluláris mátrix (ECM) elemeihez való kapcsolódása. A sejtadhézió mérésére sokféle módszert lehet alkalmazni, többek között az anyag és különböző egészségügyi tudományokban használt atomerő-mikroszkópot (AFM), illetve annak módosított változatát a nanofluidikai atomerő-mikroszkópot (FluidFM). Sejtbiológiai alkalmazások esetén AFM-mel megfigyelték, hogy a sejtek eltérő rugalmassága információt hordozhat az embrionális fejlődésre, a gyulladásra és a tumoros elváltozásokra vonatkozólag. Hasonló kvantitatív biológiai információk méréséhez nyújthat még nagyobb segítséget a nanofluidikai atomerő-mikroszkóp, hiszen segítségével élő sejteket, és a sejtben lezajló folyamatokat vizsgálhatjuk egy precíz automatizált rendszer segítségével.

A FluidFM-mel lehetőség nyílik kolloid spektroszkópiára, sejtek vagy baktériumok adhéziójának mérésére, sejtek tartalmának kiszívására és folyadékok befecskendezésére, illetve nanolitográfias mintázatkialakításra és nano-struktúrák építésére is [1]. A különböző alkalmazásokhoz eltérő mérőfejeket használunk, melyek végén található fluidikai kivezető nyílásai 30 nm-től 8 μm -ig terjednek.

1.1. Témafelvetés

A FluidFM, mint nanofluidikai atomerő-mikroszkóp, egy új technológia, mely az atomerő-mikroszkóp egy kiterjesztésének tekinthető. FluidFM tük alapanyaga egykristályos szilícium vagy szilícium-nitrid, amelyet fotolitográfiával és anizotrop kémiai maratással alakítanak ki. A konzol struktúrájával, valamint anyagi összetételével, pl. SiN aránnyal a fontosabb fizikai paramétereit széles tartományban lehet szabályozni.

A FluidFM konzolok felépítésükben jelentősen eltérnek a hagyományos AFM konzoloktól, így azoknak a módszereknek a használata, amelyek a szakirodalomban elfogadottak, ill. azoknak alkalmazhatósága kérdésessé válhat FluidFM konzolok esetén. A következő fejezetekben az elméleti háttér ismertetésével megmutatom, hogy azok a gyakorlati módszerek, melyek a konvencionális atomerő-mikroszkópiánál elfogadottak, FluidFM mikroszkóp esetén milyen elvi hibákat vihetnek a mérésbe.

Ezek a paramérek közvetlenül befolyásolják például a rugóállandó mérését, mely pontos kalibrációja elengedhetetlen az erőspektroszkópiához. A rugóállandó méréséhez használt termikus zajspektrumon, a Lorentz-görbe illesztéséből, valamint a konzol viszkózus közegben történő leírására használt hidrodinamikai függvény regressziójának hibájából adódó szórásokból olyan nagyságrendű pontatlanságok terhelhetik a mérést, melyek annak hitelességét erősen ronthatja.

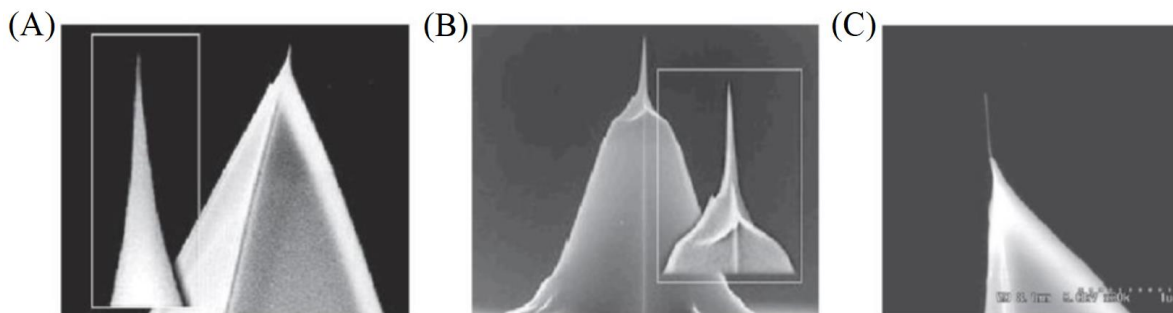
Munkám során alternatív módszerek használhatóságát vizsgáltam, melyhez először a FluidFM konzol geometriai modelljét alkottam meg. Végeselem-módszer segítségével meghatároztam a konzol rezonanciafrekvenciáit, majd azokkal az új hidrodinamikai függvényt. Ezután kísérleti módszerekkel vizsgáltam a szimulációs eredményeimet, és az új hidrodinamika függvénnyel a konzol rugóállandóját számoltam ki.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

Ebben a fejezetben bemutatásra kerül a kutatási témámhoz kapcsolódó szakirodalom, amely ismerete elengedhetetlen munkám céljának és eredményeim megértésének szempontjából. Az áttekintés fejezetekben bemutatom az atomerő-mikroszkóp elméleti hátterét, FluidFM mikroszkóp, és a FluidFM konzolok felépítését, valamint azokat a gyakorlati módszereket, amelyek használata szükséges a műszer kalibrálásához és a mérés végrehajtásához.

2.1. Atomerő-mikroszkóp

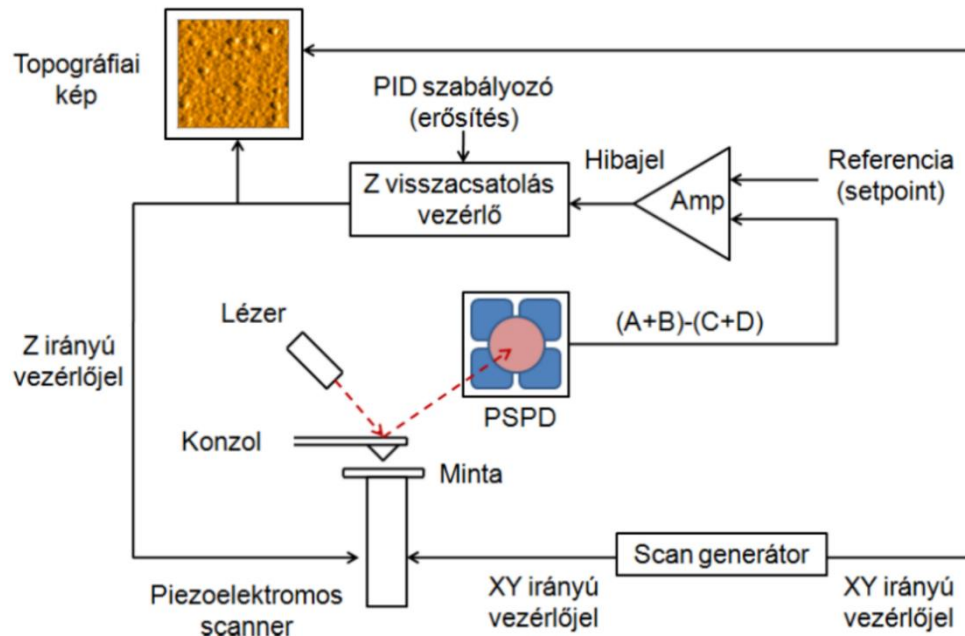
Az atomerő-mikroszkóp (AFM) olyan képalkotó módszer, amely közel atomi felbontással térképezi fel a mérendő objektum topográfiáját. Ehhez egy piezoelektromosan mozgatott, ismert geometriájú és méretű tűvel pásztázzák a felszínt. Az AFM szondája egy igen hegyes tű, melynek nem kell elektromosan vezetőnek lennie. Általában a tűk alapanyaga szilícium (Si), vagy szilícium-nitrid (SiN). A tömbi szilíciumból elektrokémiai- és/vagy fókuszált ionsugaras marással, fotolitográfiával alakítják a tű geometriáját és a hegyének görbületi sugara jellemzően a párszor 10 nm-es tartományba esik. (1. ábra)



1. ábra Pásztázó elektronmikroszkópos képek három eltérő technológiával készült Si alapú AFM tűről.
A) Elektrokémiai marás, B) Fókuszált ionsugaras marás, C) Szén nanocső ragasztással [2]

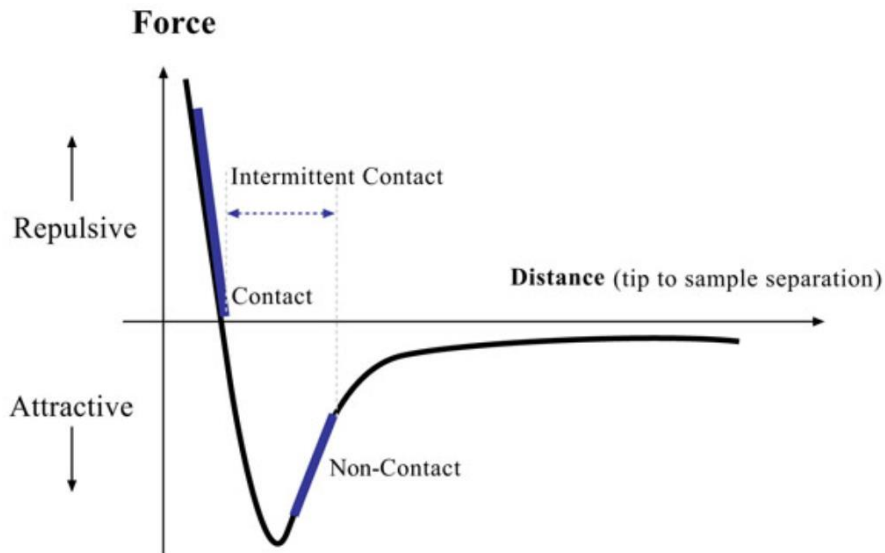
A rugós tartókonzolban ébredő erő mérése az AFM egyik központi eleme. A tű és a felület között fellépő atomi vonzó és taszító erők hatására a konzol meghajlik, a konzolra irányított és onnan visszaverődő fókuszált lézernyaláb kitérését okozzák egy négyszegmensű fotodetektoron. Az érzékenységet a rugólapka meghajlásának 0.01 nm pontosságú detektálása biztosítja. A fotodióda szegmensein mért feszültségből kiszámolható, hogy a lézerfolt pontosan

hova vetődik a detektor felületén. Ha minden szegmensre azonos fényintenzitás kerül, akkor a lézerfolt középre esik, ettől eltérő esetekben a szegmensek feszültségének különbségéből határozzák meg a lézerfolt helyzetét (2. ábra). Ahhoz, hogy a minta felületét a tű pontosan követni tudja, egy visszacsatolásra van szükség. [3]



2. ábra Atomerő-mikroszkóp blokkvázlata [2]

A tű és a minta anyagától függően sokféle kölcsönhatás felléphet köztük. Alapesetben a tű és a minta között Van der Waals típusú erő hat (3. ábra), a mintához közeledve az erő nagysága nő, míg elér egy maximumot néhány atomnyi távolságra (Van der Waals távolság). Ha ennél is közelebb kerül a tű hegye a mintához, akkor taszító erő lép fel, amely meredeken nő, ahogy a távolság csökken. Különböző mérési módban a konzolra eltérő nagyágú és irányú erők hatnak. Kontakt (contact) üzemmódban van a mintához legközelebb a tű hegye, ekkor erős taszítás jellemezi a tű-minta kölcsönhatást. Nem-kontaktus (non-contact) üzemmódban a tű hegye az erősen taszító tartományon kívül marad. Az ún. „tapping” vagy kopogtató üzemmódban a kontakt és a non-kontakt tartomány közt mozog a tű hegye.



3. ábra Az AFM tűje és a minta felülete közt ható erő sematikus ábrázolása a tű-minta távolság függvényében. [4]

A minta pásztázása nélkül, a tűt egy jól meghatározott pontja fölött függőleges irányban mozgatva a tű-minta kölcsönhatás távolság-függéséről kaphatunk információt. A molekuláris szintű kölcsönhatások vizsgálatokor fontos eszköz az AFM spektroszkópiai üzemmódja, mellyel akár egyetlen kémiai kötés, vagy akár pN-os erejű kölcsönhatás is feltérképezhető.

Az AFM a konzol elmozduláskor a fotodiódán bekövetkező feszültségváltozást regisztrálja. Az így kapott elmozdulás-feszültség görbét a megfelelő átskálázással elmozdulás-erő görbére alakítjuk. A rugós tartókonzolra ható erő nagyságát a Hooke-törvény (2.1) írja le. [5]

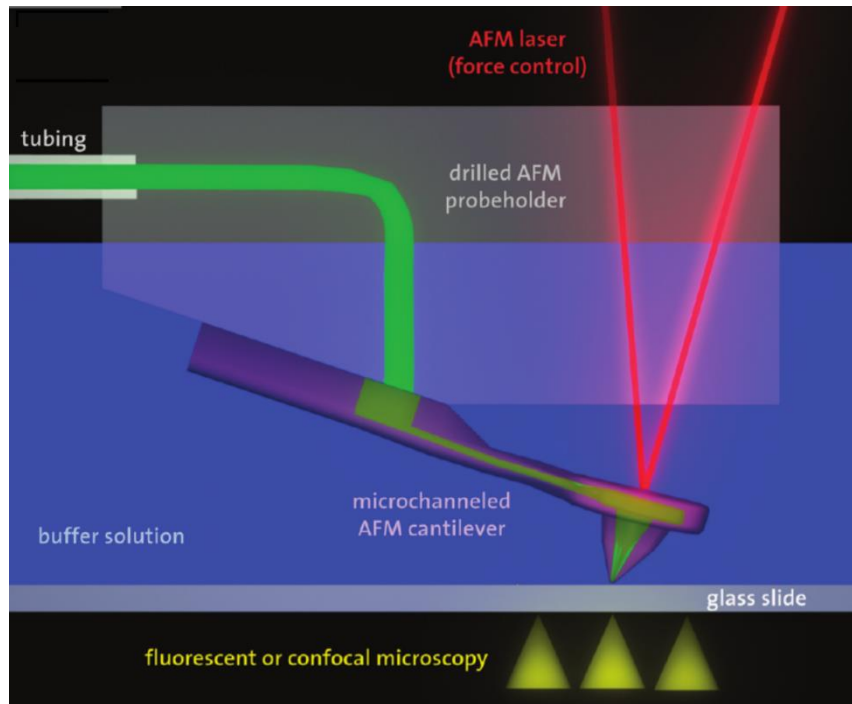
$$F(t) = k * \delta(t) = k * U(t) * InvOLS \quad (2.1)$$

Ahol $k [N]$ a konzol rugóállandója, $InvOLS [\frac{m}{\mu V}]$ az inverz optikai érzékenység, $U [\mu V]$ pedig az elmozdulás közben regisztrált feszültségváltozás.

2.2. Fluidikai atomerő-mikroszkóp felépítése

A Fluidikai atomerő-mikroszkóp (FluidFM) a hagyományos AFM utódjának tekinthető. Létrehozásának motivációja egy olyan nanofluidikai rendszer, mellyel fizikai, anyagtudományi vagy biológiai mérések végezhetőek.

Ennek eléréséhez a rugós tartókonzol ebben az esetben egy fluidikai csatornát tartalmaz, ez egy külső nyomás-szabályozó egységhez van csatlakoztatva (4. ábra). A konzol megfelelő rögzítésének köszönhetően a FluidFM használható levegőn vagy különböző folyadékokban is. Eltérés az AFM-ekhez képest, hogy a rugós konzolt tartó műanyag házban egy rezervoár található, mely folyadéktárolásra lett kialakítva, az a kapilláris erő hatására jut be a konzol belső csatornájába. A nyomásszabályozó rendszerrel képesek vagyunk akár 1000 mbar nyomást kapcsolni a konzolra, ennek előjelét pedig szabadon változtatni.

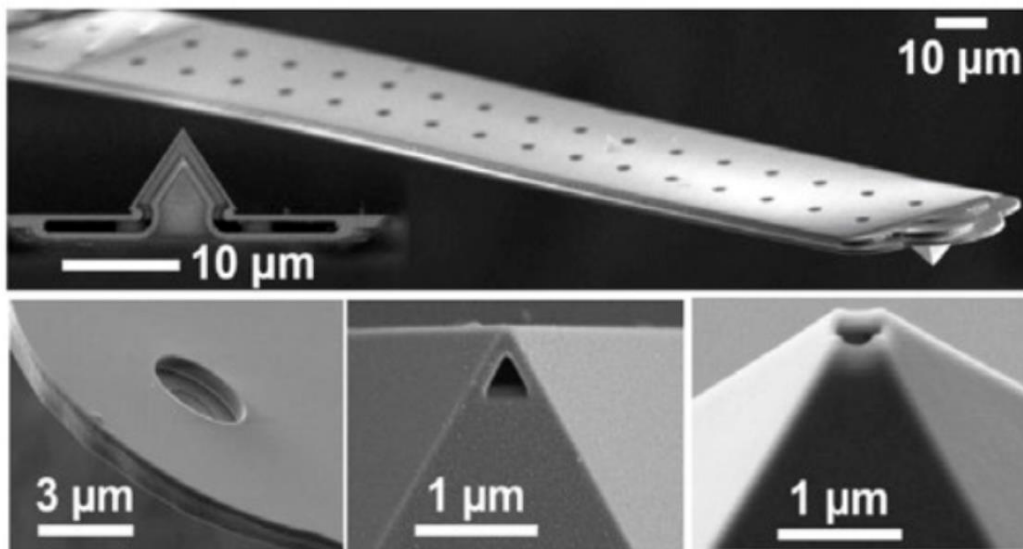


4. ábra A FluidFM az AFM és a nanofluidikai csatornák kombinációja. Az így kialakított speciális mikroszkóppal nem csak erőmérésre, de folyadék injektálására, vagy éppen kiszívására is van lehetőség. [6]

A mintákat egy x-y síkban mozgó mágneses, robotizált mintatartó fogadja, melyet számítógéppel lehet irányítani. A konzol Z-irányú mozgását a hagyományos AFM-hez hasonlóan egy piezo-aktuátor segítségével mozgatjuk. A konzolra fókuszált lézerfény kitérését ebben az esetben egy kétszegmenses fotodiódán érzékeljük, melynek jele egy visszacsatoló körön keresztül felel a pontos magasság érték beállításáért.

2.3. FluidFM konzolok felépítése

Többféle felépítésű konzol létezik FluidFM BOT műszerhez a különböző mérési feladatok elvégzéséhez. Mivel a FluidFM legjelentősebb tulajdonsága a konzolba integrált csatorna, ezért mindegyik konzol végén az adott alkalmazáshoz szükséges struktúrájú apertúra található. Ezek méretei 300 nm-től egészen 8 μm -ig változhatnak, a különböző lyuk-átmérőkhöz pedig különböző formájú hegyek definiáltak. FluidFM konzolok hasonló anyagból és technológiával készülnek, mint a hagyományos AFM konzolok. A szilícium egykristályt (Si), vagy szilícium-nitrid (SiN) konzolokat legfőképp fotolitográfiával kombinált anizotróp kémiai maratással alakítják ki. Az így elkészített konzolokat egy műanyag hordozóra ragasztják, annak belsejében pedig egy μL nagyságrendű rezervoárt alakítanak ki. A különböző apertúrával rendelkező tűk geometriájukban azonban nagyon hasonlóak, az üreges csatornát a konzol belsejében két sor oszlop támasztja alá, a megfelelő merevség eléréséhez. A konzolok hossza 200 μm , és két darabból vannak „összebondolva”. Az alsó 36 μm , míg a felső lap 30 μm széles, a csatornát alátámasztó oszlopok átmérője 3 μm , belőlük 17 sor, soronként 2 db található. A csatorna belső magassága 1 μm , míg a teljes konzol vastagsága 1.7 μm .



5. ábra Elektronmikroszkópos képek a különböző kimeneti struktúrájú FluidFM tűkről. [7]

A mikropipetta konzolok (5. ábra) sejtdhézió mérésre alkalmasak. Ezek kimeneti apertúrája 2 μm , 4 μm és 8 μm átmérővel, és lapos kialakítással rendelkeznek. Míg korábbi AFM-es erőspektroszkópia mérésekben kémiai anyagokat vittek fel a tű hegyére, melyekhez az adhézió

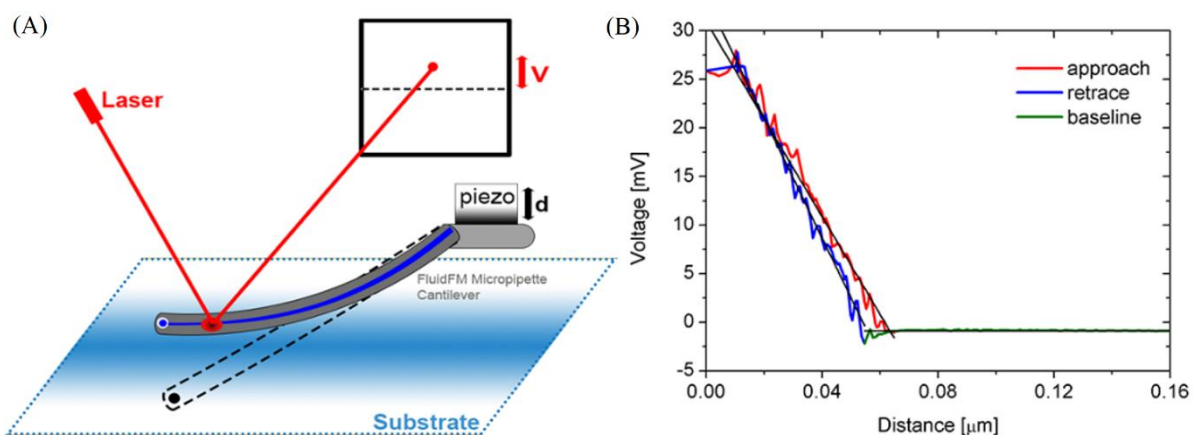
szempontjából lényeges sejteket rögzíteni tudják, FluidFM nanofluidikai és nyomásszabályozási megoldásával csökkenteni lehet az erőspektroszkópia mérés anyag-, energia- és időigényét. [8] Mikropipetta konzolok továbbá kolloid spektroszkópiához is alkalmazhatóak, ahol a kolloid részecskék sugara 1-50 μm nagyságú lehet. [6]

A nano-fecskendővel (5. ábra) sejtek belsejébe tudunk akár fL-es nagyságrendben folyadékot bejuttatni, vagy onnan épp kiszívni, így pertubálva a sejtek belső folyamatait. A piramis alakú tű végén lévő nyílás 100-300 nanométeres átmérőjű lehet. A hagyományos AFM szondákra legjobban hasonlító nano-pipetta (5. ábra) végén egy 54.7° -os nyílásszögű piramis alakú tű található. Az apertúra méretének és elhelyezkedésének köszönhetően alkalmazható többek között nanolitográfias megmunkálásra.

A FluidFM konzolok egy fontos paramétere többek között a nominális rugóállandó. Bár a gyártó közli az egyes konzolok rugóállandóját, mérések előtt fontos azokat pontosan meghatározni. A mérési bizonytalanságok miatt pl. külső zajok, vagy a konzolra kerülő kosz miatt azonban a mért rugóállandó változhat.

2.4. FluidFM konzolok optikai érzékenysége és rugóállandója

FluidFM az atomerő-mikroszkóphoz hasonlóan a konzolra fókuszált lézerefény visszaverődését egy fotodetektorral érzékeli (6./A ábra). A detektoron középre irányított lézerefény a két szegmensen ugyanakkora feszültséget generál, ha a konzol elhajlik, az a fókuszált lézer kitérését okozza, így a feszültség viszonyok megváltoznak.



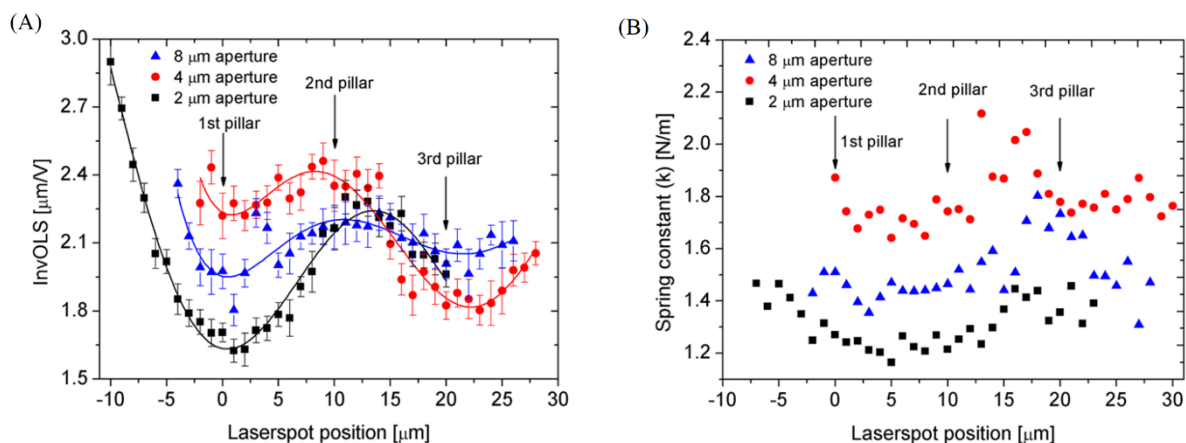
6. ábra (A) FluidFM pozicionáló lézer sematikus felépítése
(B) Inverz optikai érzékenység kalibrálásának görbéi [7]

Az inverz optikai érzékenység (*InvOLS*) megmutatja, hogy az elhajlás mértékében hogyan változik a fotodetektoron regisztrált feszültség (2.4.1). Ennek meghatározásához a konzolt általában egy ideálisan kemény és lapos felületre, például szilícium szeletre nyomják.

$$InvOLS = \frac{\Delta z}{\Delta U} \quad (2.4.1)$$

Ahol $InvOLS \left[\frac{\mu m}{V} \right]$ a konzol inverz optikai érzékenysége, $\Delta z [\mu m]$ a z-irányú elmozdulás, $\Delta U [V]$ a fotodetektor feszültsége. Konzulenseim a FluidFM műszer használata közben megfigyelték, hogy az *InvOLS* kvantitatív értéke nagymértékben függ a fókuszált lézer fény pozíciójától. (7./A ábra). A jelenség a strukturálisan inhomogén felépítésű FluidFM konzolok lokális deformációs eltéréseivel magyarázható [5].

Mivel az inverz optikai érzékenység szükséges a Hooke-törvényhez (2.1), így ennek minél precízebb mérése kritikus. Konzulenseim vizsgálták tehát, hogy a fókuszált lézer fény pozíciójától hogyan függ a mért *InvOLS* érték FluidFM mikropipetta konzolok esetén. Azt kapták, hogy a legkisebb inverz optikai érzékenységet- így a legnagyobb optikai érzékenységet- az első pillérre irányított lézer pozícióban kaphatjuk. Azonban az ide irányított lézer az interferenciákból adódóan az *InvOLS* érték erősen zajjal terhelt.



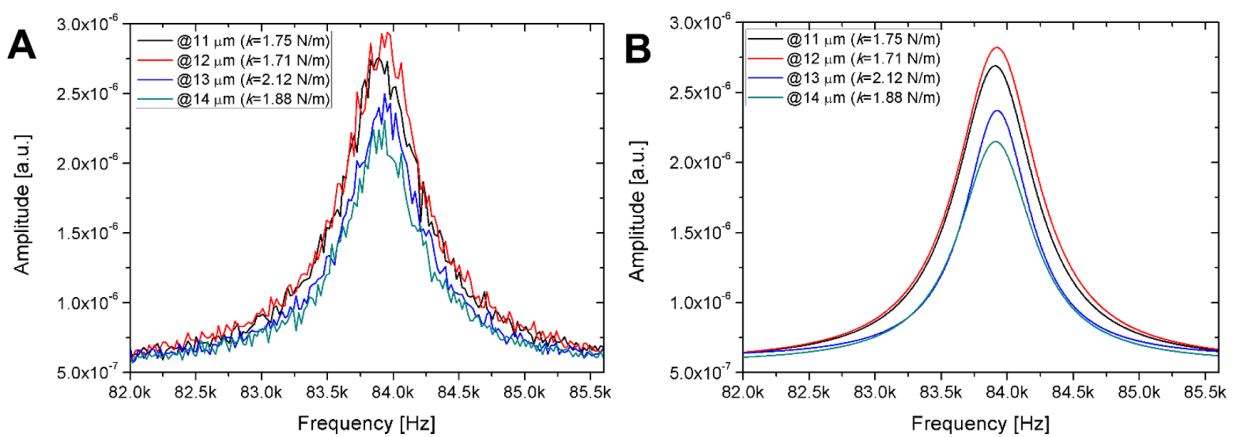
7. ábra (A) Az inverz optikai érzékenység függése a lézerfolt függvényében,
(B) Megfigyelhető, hogy a számolt rugóállandó értéke szintén
függ a lézerpozíciótól. [7]

Ezen megfontolások alapján javaslatot tettek [7] a harmadik pillérsorra helyezett lézer pozícióra, ugyanis az *InvOLS* értéknek itt található a következő lokális minimuma (7./A ábra).

Rugóállandó meghatározásához szükséges a konzol rezonanciafrekvenciájának és jóságai tényezőjének a pontos értéke. A mérést ismét a konzolra irányított lézer segítségével végezzük, oly módon, hogy megmérjük a konzol termikus zajspektrumát. Mivel bármely merev test az

abszolút nulla fok felett valamely véges termikus energiával rendelkeznek, az őt felépítő atomok makroszkopikus szinten is érzékelhető rezgőmozgást végeznek. Ezt a nagyon kis mozgást a megfelelő érzékenységű fotodetektorok segítségével feszültségváltozássá alakítjuk, majd a kapott görbét Fourier-transzformálva megkapjuk a zaj spektrális eloszlását.

A rezonancia csúcs megtalálása a spektrumon egyszerű feladat, így a rezonanciafrekvencia könnyedén leolvasható. Problémát a Q_c jósági tényező mérésének bizonytalansága okozza. Az előzőleg meghatározott rezonancia csúcsra egy Lorentz-görbét illesztnek, ennek a görbének keresik a félértékszélességét. Mivel külső zajok szuperponálódhatnak a mért zajspektrumra, ami a rezonancia csúcsot megváltoztathatják, így az illesztett Lorentz-görbét és így a görbe félértékszélességét befolyásolják.



8. ábra (A) FluidFM-el mért rezonanciacsúcs (B) valamint a csúcsra illesztett Lorentz-görbe.

Az fókuszált lézer pozíciójának függvényében, valamint a külső perturbáló zajok miatt a Lorentz-görbe illesztése változik (8/B ábra). A jósági tényező a rezonanciafrekvencia, valamint az illesztett Lorentz-görbe hányadosa. Az ábrán látható (8/A ábra), hogy a mért rezonanciacsúcsok zajjal terheltek, látható továbbá a különböző görbeillesztéskor hogyan változik a konzol mért rugóállandója. Mivel a jósági tényező szerepel a FluidFM konzolok rugóállandójának meghatározására szolgáló Sader-módszerben, így annak változása befolyásolja a mért rugóállandó értékét.

2.5. A Sader-módszer

Az alapvető AFM és FluidFM-mel végzett mérések első lépésének tekinthető a rugós tartókonzol inverz optikai érzékenysége és rugóállandójának meghatározása. Az utóbbihoz az ún. Sader-módszert (2.5.1) használjuk a legtöbb AFM- és a FluidFM BOT műszerekben. [9]

$$k = 0.1906\rho_c w^2 L Q_c \Gamma(\omega) \omega^2 \quad (2.5.1)$$

Ahol k [N] a konzol rugóállandója, ρ_c [$\frac{kg}{m^3}$] a konzol sűrűsége, w, L [μm] a konzol szélessége és hossza, Q_c a jósági tényező, ω [$\frac{rad}{s}$] a körfrekvencia, $\Gamma(\omega)$ pedig a frekvenciafüggő komplex hidrodinamikai függvény valós része. Ahhoz, hogy a rugóállandót Sader-módszerrel lehessen meghatározni, szükségünk van a néhány alapvető konzolparaméterre.

Sader-ék négyzetes alakú, a hosszúságához képest elhanyagolható vastagságú AFM konzolra vezették le az (2.5.1) egyenletet, így annak használata felvet néhány kérdést a FluidFM üreges, nem teljesen négyzet alakú konzolok esetében. Továbbá a FluidFM konzolok csatornáját pillérek támasztják alá, a csatornában pedig folyadék található, így ρ_f konzol effektív sűrűsége is változik. A rugóállandó kiszámításához szükséges továbbá a konzol rezonanciafrekvenciájának meghatározása, melyet nagy pontossággal tudunk mérni.

Mivel sok esetben a méréseket puffer folyadékban végzik, így a rugóállandó meghatározásához figyelembe kell venni a konzol mozgását nem csak levegőn, de viszkózus közegekben is. A folyadékba helyezett konzolok rezonanciafrekvenciája csökken, mert arra csillapító erő hat. A folyadék és a konzol dinamikáját a (2.5.2)-es egyenlet írja le. [5]

$$EI \frac{\partial^4 w(x,t)}{\partial x^4} + \mu \frac{\partial^2 w(x,t)}{\partial t^2} = F(x,t) \quad (2.5.2)$$

Ahol E [Pa] a konzol Young-modulusa, I [$kg \cdot m^2$] a tehetetlenségi nyomatéka, F [N] a külső konzolra ható erő és $w(x,t)$ a konzol dinamikus elhajlását leíró egyenlet. Az egyenletet Fourier transzformálva az két komponensre bontható: a konzol meghajtásából származó erőkre és egy a konzol körüli közegből származó erőre. Folyadékok dinamikáját a legjobban leíró modell a Navier-Stokes egyenletrendszer (2.5.3; 2.5.4).

$$\rho_f (u \nabla) u = \nabla \cdot (-p I_M + \mu (\nabla u + \nabla u^T)) \quad (2.5.3)$$

$$\nabla \cdot u = 0 \quad (2.5.4)$$

Ahol $\rho_f \left[\frac{kg}{m^3} \right]$ a folyadék sűrűsége, $\mu \left[Pa \cdot s \right]$ a folyadék viszkozitása, I_M az egységmátrix, $u \left[\frac{m}{s} \right]$ a sebességet leíró vektor. Bár az egyenlet megoldásához olyan kikötéseket kell tenni, mint: a folyadék legyen homogén, izotróp és Newtoni, még e szigorúnak tűnő feltételek mellett is a legpontosabban írják le a folyadék áramlását a konzol körül. A legpontosabb dinamikai viselkedést tehát a Navier-Stokes egyenlet írja le, azonban ennek általános, zárt analitikai megoldása nem létezik. A hidrodinamikai terhelés kifejezésére ezért bevezetünk egy $\Gamma(\omega)$ hidrodinamikai függvényt (2.5.5) [5], mely a Navier-Stokes egyenlet speciálisan AFM konzolra adott megoldása.

$$\Gamma(\omega) = \begin{cases} 1, & Re \rightarrow \infty \\ \frac{-4i}{Re \ln(-i\sqrt{Re})}, & Re \rightarrow 0 \end{cases} \quad (2.5.5)$$

Ahol Re a dimenzió nélküli Reynolds-szám (2.6.3). Segítségével a konzolok rezonanciafrekvenciája és jósági tényezőjének változása könnyedén meghatározható az ω körfrekvencia, és a Reynolds-szám függvényében. Mivel a hidrodinamikai függvény speciálisan AFM konzolok geometriájából van levezetve, így használata FluidFM konzolokra nem bizonyul alkalmasnak.

Sader-módszer továbbá használja a Q_f jósági tényezőt, melynek mérése nagyban befolyásolja a számolt rugóállandó értékét. Az előző pontban (2.4 FluidFM konzolok optikai érzékenysége és rugóállandója alfejezet, [7]) bemutatott jósági tényező méréséből látszik, hogy a berendezés nagy szórással tudja csak meghatározni azt.

2.6. A Payam és munkatársai által kidolgozott módszer

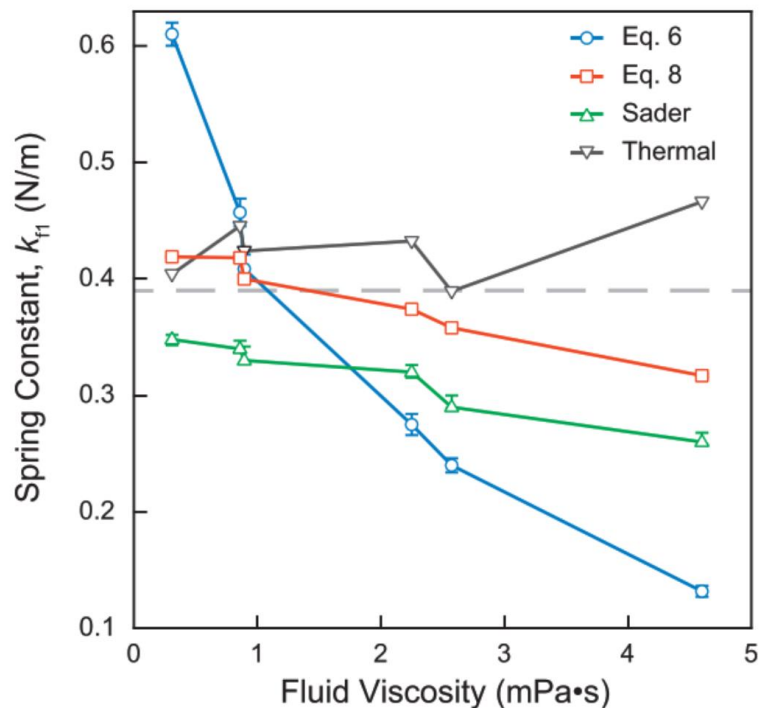
Payam és mtsi. által 2018-ban publikált módszerét [10] viszkózus közegben, tetszőleges alakú konzolok rugóállandójának meghatározásához dolgozták ki. Mivel az elmúlt években rengeteg új geometriájú konzol került a piacra, mint pl. a FluidFM konzol is, szükségessé vált egy új, alkalmazható módszer, mely kis szórással produkálni tudja a konzol rugóállandóját viszkózus közegekben is.

Payamék módszere a rugóállandó meghatározására (2.6.1) ígéretes FluidFM konzolok esetén, mivel figyelembe veszi a konzolok alapvető tulajdonságait, mint geometria és rezonanciafrekvencia, azonban a Sader-módszerrel (2.5.1) ellentétben a Q_f jósági tényezőt

eliminálja, mely szórása nagymértékben befolyásolja k rugóállandó értékét. (Bővebben a 2.4 FluidFM konzolok optikai érzékenysége és rugóállandója fejezetben).

$$k_f = \frac{\omega_{f1}^2 \pi a_1 \rho_f b + 2 \omega_{f1}^{3/2} \pi a_2 \sqrt{\rho_f \eta}}{16(\omega_{a1}^2 - \omega_{f1}^2)} b L \omega_{a1}^2 \quad (2.6.1)$$

Ahol ρ_f a konzolt körülvevő folyadék sűrűsége, η a folyadék viszkozitása, a_1, a_2 a hidrodinamikai függvény regressziós együtthatói, b a konzol szélessége, ω_f, ω_a a konzol rezonancia frekvenciája folyadékban, és levegőn mérve.



9. ábra Egy 0.4N/m nominális rugóállandójú konzolt különböző módszerekkel vizsgálva, a rugóállandó értéke nagymértékben változik a konzolt körülvevő folyadék viszkozitásának függvényében. [10]

A módszer használatának előnye, hogy olyan paraméterek, melyek nagy szórást vihetnek, a mérésbe kiküszöbölhetővé válnak. Rugóállandó meghatározására több módszer összehasonlítva (9. ábra) az látható, hogy Payam-módszer alacsony viszkozitású közegekben mérve nagy pontossággal hozza a nominális rugóállandó értéket, magasabb viszkozitású közegekben pedig kisebb relatív hibával tudja visszaadni azt.

A viszkózus közeg csillapítását leíró $\Gamma(\omega)$ hidrodinamikai függvénynek az analitikus zárt formája nem létezik, általános geometriájú konzolokra, így azt egy egyszerű regresszióval (2.6.2) közelítjük. [11]

$$\Gamma(\omega) = a_1 + \frac{a_2}{\sqrt{Re}} \quad (2.6.2)$$

Ahol a_1, a_2 a hidrodinamikai függvény regressziós együtthatói, Re a Reynolds-szám. A Reynolds-szám (2.6.3) egy dimenzió nélküli mennyiség, mely a tehetetlenségi erők és a közeg belső súrlódása közötti viszonyszám, mely Maali-ék cikkéből [11] az alábbi módon határozható meg AFM konzolokra.

$$Re = \frac{\rho_f \omega_{f1} b^2}{4\eta} \quad (2.6.3)$$

A konzol mozgásegyenleteiből kiindulva Payam-ék [10] levezettek egy összefüggést (2.6.4), mely a konzol rezonanciafrekvenciái és a hidrodinamikai függvény regressziós együtthatói közt teremt kapcsolatot.

$$\omega_{fn}^2 \left(\frac{\pi a_1 \rho_f b}{4\rho_c h} + 1 \right) + \omega_{fn}^{\frac{3}{2}} \left(\frac{\pi a_2 \sqrt{\eta \rho_f}}{2\rho_c h} \right) = \omega_{an}^2 \quad (2.6.4)$$

Ahol ρ_f, ρ_c a folyadék és a konzol sűrűsége, η a folyadék viszkozitása, b, h a konzol szélessége és magassága, ω_a, ω_f a konzol körfrekvenciája levegőn, illetve folyadékban, a_1, a_2 hidrodinamikai függvény regressziós együtthatói. Látszik tehát, hogy amennyiben a konzol első ($n = 1$) és második ($n = 2$) rezonancia frekvenciái ismertek, felállítható a (2.6.4) egyenlet alapján egy egyenletrendszer, amelynek megoldásával meghatározhatjuk a vizsgált konzolok regressziós együtthatóit.

A céloom ezek alapján, hogy szimulációs módszerekkel meghatározzam a FluidFM mikropipetta konzolok levegőn és vízben mért első két rezonancia frekvenciáját, majd ezekből a (2.6.4) egyenlet és a konzol geometriai paraméterei segítségével meghatározzam a konzol viselkedését leíró hidrodinamikai függvény regressziós együtthatóit. Ezek felhasználásával a (2.6.1) egyenlet alapján meghatározható a konzolok rugóállandója, pusztán a levegőn, ill. vízben mért első rezonancia frekvenciák segítségével.

3. KÍSÉRLETI ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Comsol Multiphysics 5.3a

Munkám során FluidFM konzol rugóállandójának meghatározására végeelem-módszeren (Finite Element Method, FEM) alapuló COMSOL Multiphysics 5.3a nevű numerikus szimulációs szoftvert használtam. A program segítségével lehetőség nyílik kettő- illetve háromdimenziós geometriák létrehozására, különböző közegek definiálására. A szoftver segítségével parciális differenciálegyenlet rendszereket numerikusan tudunk megoldani az egyes tartományokra.

3.2. Acoustic-Solid Interaction modell

Az Acoustic-Solid modell a Comsol Multiphysics egy beépített fizikája. Segítségével elasztikus hullámok terjedése számolható szilárdtestekben, folyadékokban pedig nyomáshullámok viselkedését lehet vizsgálni. Az Acoustic-Solid fizikai modell az alábbi differenciálegyenletek segítségével határozza meg a konzol a rezonanciafrekvenciáit.

$$-\rho\omega^2 u = \nabla \cdot s \quad (3.2.1)$$

$$\nabla \cdot \left(-\frac{1}{\rho_c} (\nabla p_t - q_d) \right) - \frac{k_{eq}^2 p_t}{\rho_c} = Q_m \quad (3.2.2)$$

$$p_t = p + p_b \quad (3.2.3)$$

$$k_{eq}^2 = \left(\frac{\omega}{c_c} \right)^2 \quad (3.2.4)$$

$$-i\omega = \lambda \quad (3.2.5)$$

A differenciálegyenletek megoldásához a szoftvernek meg kell adni a kezdeti peremfeltételeket. Solid fizika modulban található egyenletek megoldásához definiálni kell a konzol felfogatási pontját, mely ebben az esetben a konzol végét jelenti. Ehhez a peremhez tökéletesen rugalmatlan felfogatást, és nulla kezdeti sebességet állítottam be. A Solid fizikai modulhoz továbbá meg kell adni, azokat a tartományokat, melyek tulajdonsága lineárisan elasztikus. Az Acoustic fizikai modulban alá tartozó differenciál egyenletek megoldásához a

konzolt körülvevő közegek akusztikai nyomását, illetve a közeget körülvevő falakat kellett definiálni. A közegben viszkózus modellt használok, 0 Pa kezdeti nyomásértékekkel.

3.3. Sejtadhézió mérés FluidFM BOT-tal

1. Eszközök:

- a. VERO és HeLa sejt kultúra, VERO DMEM, dPBS, 1x TE PBS-ben oldva
- b. HPMI puffer:
 - a. 9 mM glucose
 - b. 10 mM NaHCO₃
 - c. 119 mM NaCl
 - d. 9 mM HEPES
 - e. 5 mM KCl
 - f. 0.85 mM MgCl₂
 - g. 0.053 mM CaCl₂
 - h. 5 mM Na₂HPO₄×2H₂O
 - i. pH 7.4
- c. 2%-os zselatin oldat PBS-ben oldva 0,02%-ra hígítva (0.2 mg/ml)
- d. Corning 6-well non-coated plate
- e. Beckman Coulter Allegra X-30r centrifuga
- f. 8 µm-es mikropipetta konzol, 2 N/m-es nominális rugóállandó

2. Sejtek előkészítése:

- a) A mérést megelőző napon 0,02%-os zselatinoldattal felületkezelés és VERO sejtek kirakása, hogy másnapra monoréteget képezzenek.
 - i) Ibidi csészébe és Corning 6-well non-coated plate 4 welljébe 1-1 ml zselatinoldat pipettázása, inkubátorban polimerizálás 20 min, folyadék leszívása, 2x mosás PBS-sel, és PBS-ben tárolni
 - ii) VERO sejtek felszedése TC csészéről 1x-os TE-vel. Ibidi csészébe és a Corning plate 2 welljébe 300-300 µl sejt pipetázása. Inkubálás 1 éjszaka.
- b) A konfluens monorétegbe szerveződött sejteket a mérés napján kivesszük az inkubátorból és FluidFM-el vizsgáljuk fizikai tulajdonságaikat.

- i) HeLa és VERO sejtek felvétele TC csészéből 1x TE-vel, tápban 5 min 2000 rpm centrifugálás, táp leszívása, HPMI pufferben szuszpendálás, 5 min 2000 rpm centrifugálás, HPMI puffer leszívása, HPMI pufferben szuszpendálás.
- ii) HeLa és VERO sejtek elosztása az üres zselatinnal kezelt felületeken, valamint HeLa sejtek felvitele VERO sejtrétegre.
- iii) Corning plate-ben tenyésztett monoréteg FluidFM-es vizsgálata HPMI pufferben táp leszívása és puffercsere után.

3. A sejtadhézió méréshez a következő paraméterek lettek beállítva:

- a. 20 mV Set-point,
- b. 1 $\mu\text{m/s}$ konzol sebesség,
- c. -500 mBar vákuum,
- d. 5 s szünet a Set-point elérése után,
- e. 200 μm távolság.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. FluidFM konzol modelljének megalkotás

Ahhoz, hogy végeselem szimulációval meg tudjam határozni a konzolok rezonanciafrekvenciáit különböző közegekben, szükséges az általunk kutatásokban használt FluidFM mikropipetta CAD modelljének minél precízebb elkészítése.

A FluidFM-et gyártó Cytosurge által elektronmikroszkóppal készített képek (10./A ábra), Pablo Dörig 2013-as disszertációjából [6], továbbá az EK MFA Nanobioszenzorika Laboratóriumában általam sztereómikroszkóppal készített képek alapján történt a konzol méreteinek meghatározása.

Az adott geometriai paramétereket, melyet a gyártó megad, illetve Pablo Dörig doktori értekezésében hivatkozik, az alábbi táblázatban (1. táblázat) láthatóak.

1. táblázat A mikropipetta konzol adott geometriai paramétereivel

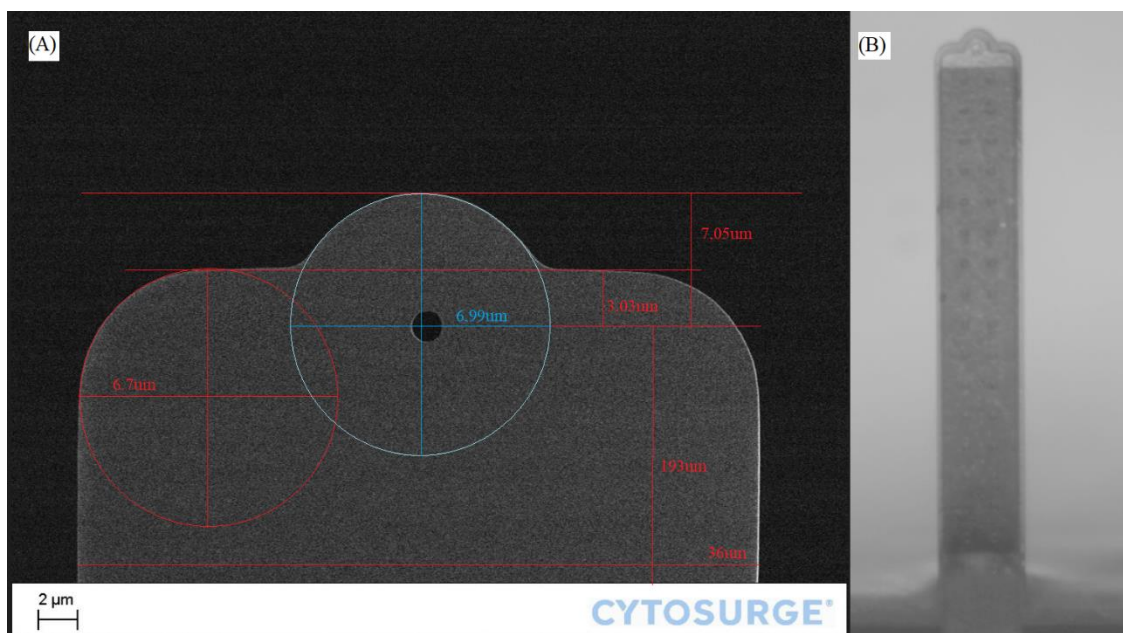
Konzol hossza	200 μm
Konzol alsó lapjának szélessége	36 μm
Konzol felső lapjának szélessége	30 μm
Csatorna belső magassága	1 μm
Teljes konzol vastagsága	1,7 μm

Ezeknek az értékeknek a gyártástechnológia miatt véges szórásuk van, így nem lehet állandónak tekinteni, azonban a későbbiekben a képek alapján történő méret meghatározáshoz referenciának használom.

4.1.1. Konzol mikroszkópos vizsgálata

Mivel konzolokat gyártó cég nem adja meg az összes paraméter, amivel a CAD modellt fel lehetne építeni, így a hiányzó értékeket a konzolról készült képek alapján kellett megállapítani. Az elektronmikroszkópos képek nagyon pontos információt adnak a konzol felületéről, így egy képszerkesztő program segítségével a pixelek pontos leszámolásával felvehetők a hiányzó geometriai adat (10/A ábra).

Tudjuk, hogy a konzol alsó blokkja $36\ \mu\text{m}$ széles, ami a SEM képen 914 pixel (px) széles, tehát $1\ \mu\text{m}$ a képen 25,4 px-nek felel meg. Konzol jobb oldali végéhez illesztett simuló kör sugara $r_1 = 170\ \text{px}$. Az apertúra átmérője 40px. A tű végén található bütyök sugara $r_2 = 177\ \text{px}$. Ezek a paraméterek a $2\ \mu\text{m}$ -es apertúrával rendelkező konzolra igazak, a többi esetén is hasonlóképpen jártam el.



10. ábra (A) Cytosurge által készített elektronmikroszkóp kép egy $8\ \mu\text{m}$ konzolról, melyre a hiányzó paraméterek kerültek, (B) Az MTA EK MFA-ban általam készített optikai mikroszkópos kép egy $2\ \mu\text{m}$ -es konzolról

A különböző apertúrájú rendelkező mikropipetta konzolok hiányzó geometriai paramétereit összesítve az alábbi táblázat (2. táblázat) mutatja.

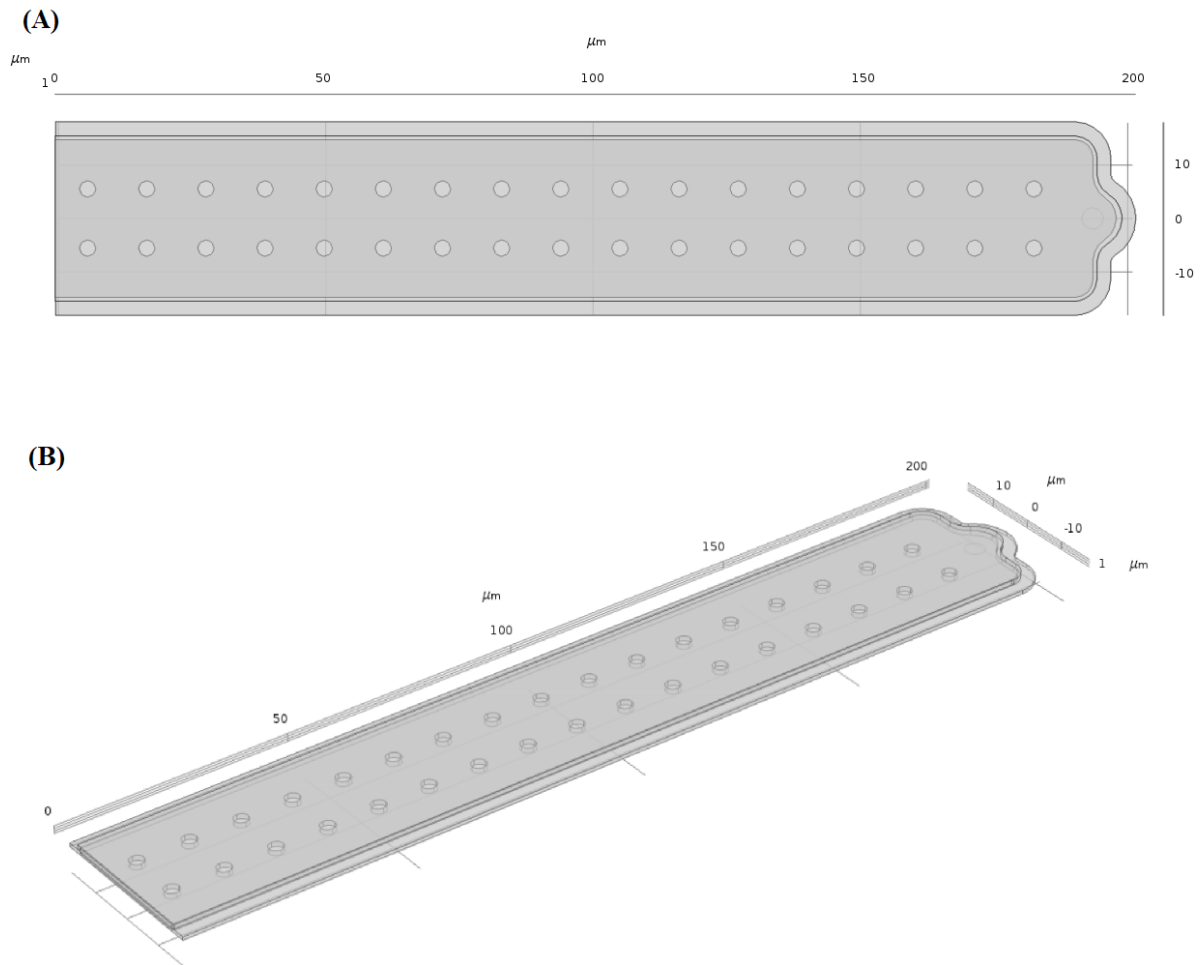
2. táblázat Konzolok hiányzó geometriai paramétereit optikai valamint elektronmikroszkóppal készült képek alapján.

	2 μm-es apertúrájú konzol [μm]	4 μm-es apertúrájú konzol [μm]	8 μm-es apertúrájú konzol [μm]
Konzol bal végénél a simuló kör sugara	6,69	7,25	6,89
Konzol hegyének sugara	6,99	8,24	10,04
Apertúra átmérője	1,57	4,11	8,46
Konzol hossza az apertúra közepéig	193	193	193
Apertúra közepe és hegyének távolsága	7,05	8,39	9,85
Apertúra közepe, és a konzol vége közti táv.	3,03	3,37	2,91

4.1.2. Comsol CAD modell

Miután minden szükséges geometriai paramétert meghatároztam, COMSOL beépített CAD tervező szoftverével megépítettem a konzolt. Három részre bontottam a geometriát, a konzol alsó- és felső lapja, valamint a csatornát egy-egy külön 2D-s síkon definiáltam, majd a megfelelő paraméterek megadásával extrudáltam ki 3D-ba.

A konzol alsó lapja 36 μm széles, 196 μm hosszú, a felső lapja 193,35 μm hosszú és 30,7 μm széles. A csatorna 192,65 μm hosszú, 29,3 μm széles, 17 sorban, soronként 2 darab 1,5 μm sugarú oszlopok támasztják alá. Az apertúra méretének függvényében a konzol hosszúsága, valamint szélessége nem változik. Az elkészült CAD modellt a (11. ábra mutatja).



11. ábra (A) Egy $4\ \mu\text{m}$ -es mikropipetta konzol 2D, illetve (B) 3D CAD modellje.

4.2. Szimulációs eredmények

A következő alfejezetekben azt vizsgálom, hogy a rezonanciafrekvenciát a különböző paraméterek, mint mesh sűrűsége, anyag és geometriai paraméterek, milyen mértékben befolyásolják. Összefoglalom az előre definiált mesh térhálóméreteit. Ezen megfontolások mentén pedig javaslatot teszek a megfelelő szimulációs modell felállítására.

4.2.1. Mesh konvergencia a frekvenciák szempontjából

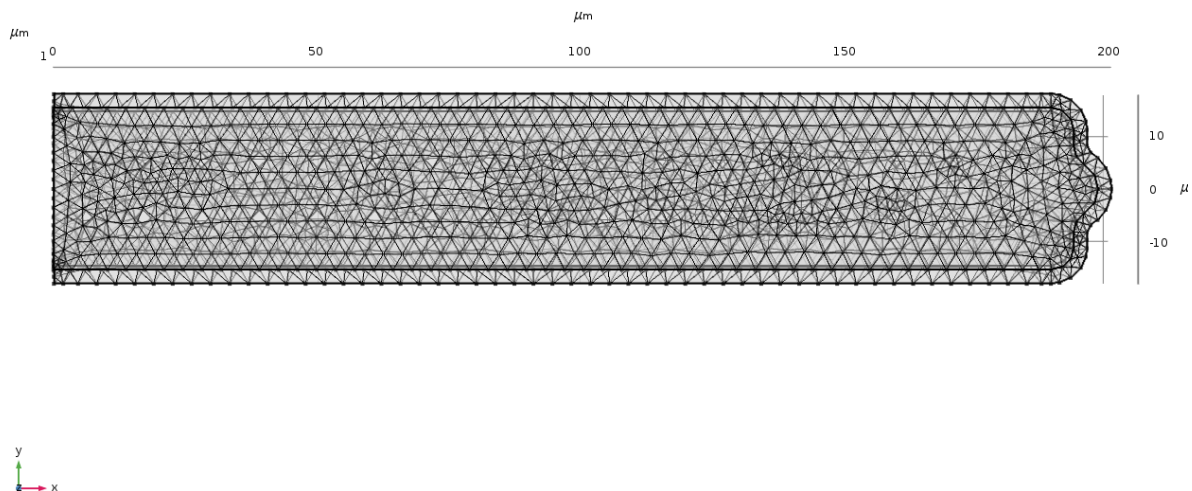
COMSOL Multiphysics szoftver a vizsgálandó objektum CAD modelljét egy algoritmus segítségével térhálóval látja el, majd a beállított fizikának és megadott peremfeltételeknek megfelelően a térháló rácspontjaiban numerikusan meghatározza a parciális differenciálegyenleteket. Először is definiálom, hogy az adott Mesh méret pontosan mekkora térháló elemekre bontja a konzol CAD modelljét.

Az előre definiált mesh méret maximális és minimális térhálóelem mérete triviális, azonban a maradék három paraméter már bővebb kifejtésre szorul. A térháló maximális nyújtási értéke megmutatja, hogy két szomszédos térhálóelem méretének aránya mekkora lehet. A görbületi faktor korlátozza, hogy az ívelt, hajlított határ mentén mekkora lehet a maximális elem méret. A felbontás keskeny szakaszokon pedig megadja, hogy szűk területen hány réteg térhálóelem helyezkedhet el. A következő táblázat (3. táblázat) tartalmazza a mikro-tartományra vonatkozó mesh paramétereket.

3. táblázat Az előre definiált mesh méretek COMSOL Multiphysics 5.3a programban.

Mesh méret	Maximális térhálóelem méret [μm]	Minimális térhálóelem méret [μm]	Térháló max. nyújtási mérték	Görbületi faktor	Felbontás keskeny szakaszokon
Coarser	47,5	10	1,7	0,8	0,3
Coarse	37,5	7	1,6	0,7	0,4
Normal	25	4,5	1,5	0,6	0,5
Fine	20	2,5	1,45	0,5	0,6
Finer	13,8	1	1,4	0,4	0,7

A FluidFM mikropipetta konzol CAD modelljét Normal mesh-el ellátva a (12. ábra) mutatja. A szimulációt finomabb mesh-et végeztem, az ábra csak illusztráció miatt került be.



12. ábra FluidFM mikropipetta konzol 'Normal' mesh hálóval ellátva.

Vizsgálni kell tehát, hogy a térháló finomságától, valamint finomságától hogyan függ a rendszer sajátfrekvenciája levegőn, illetve viszkózus közegben. A konzol rezonanciafrekvenciáinak a térháló sűrűségétől való függését levegő közegben az alábbi táblázat (4. táblázat) mutatja.

4. táblázat Konzol rezonanciafrekvenciái a mesh méretének függvényében levegő közegben.

Mesh mérete	Szabadsági fokok száma	Első rezonanciafrekvencia @levegő [Hz]	Második rezonanciafrekvencia @levegő [Hz]
Coarser	49.192	82.081	507.470
Coarse	74.272	80.510	462.100
Normal	128.854	79.876	458.910
Fine	300.101	79.204	322.600
Finer	1.342.351	79.009	234.170

Látható, hogy levegő közegben a FEM szoftver a térháló egészen durva felosztásánál is az első sajátfrekvenciát kis eltéréssel képes hozni, azonban a második frekvenciában ezek az értékek már jelentősen eltérnek egymástól.

A következő táblázat (5. táblázat) a viszkózus közegben (víz, 25 °C-on) szimulált rezonanciafrekvenciáit tartalmazza a mesh finomságának függvényében.

5. táblázat Konzol rezonanciafrekvenciái a mesh méretének függvényében viszkózus közegben.

Mesh mérete	Szabadsági fokok száma	Első rezonanciafrekvencia @víz [Hz]	Második rezonanciafrekvencia @víz [Hz]
Coarser	49.192	28.478	185.110
Coarse	74.272	27.874	177.060
Normal	128.854	27.536	173.820
Fine	300.101	27.188	169.960
Finer	1.342.351	27.040	167.620

Ebben az esetben az első frekvenciát a szoftver 1,5 kHz-es, míg a második frekvenciát már 18 kHz-es eltéréssel számolta a térháló sűrűségének függvényében.

A mesh szám növelésével tehát a frekvencia közvetlenül lehet befolyásolni, így a frekvenciák egy adott értékhez fognak konvergálni. Azonban a mesh méretének növelésével a rendszer szabadsági foka (a térháló csúcspontjai, ahol a szoftver a differenciálegyenleteket numerikusan oldja meg) meredeken nő, amivel arányosan az erőforrás-igény és az idő is nő. A legnagyobb mesh amivel a futási idő még pár órára nagyságrendbe esett a Finer felosztás (1.342.351 szabadsági fok), így a további vizsgálatokat Finer-en fogom végezni.

4.2.2. Apertúra függése a frekvenciák szempontjából

A különböző apertúrával rendelkező mikropipetta konzolok geometriája nagyon kis mértékben ugyan, de eltér egymástól (6. táblázat). Emiatt fontosnak tartom, hogy ezekre a konzolokra is külön-külön meghatározzam a sajátfrekvenciákat.

6. táblázat Különböző apertúrával rendelkező konzolok rezonanciafrekvenciái.

Apertúra átmérő	Első rez. frekvencia	Második rez. frekvencia	Első rez. frekvencia	Második rez. frekvencia
	@levegő [Hz]	@levegő [Hz]	@víz [Hz]	@víz [Hz]
2 μ m	80.130	236.120	28.812	169.240
4 μ m	79.009	234.170	27.040	167.620
8 μ m	78.752	233.950	26.870	167.010

A szimulációs eredmények alapján az eltérő geometriájú konzolok rezonanciafrekvenciái meglehetősen közel esnek egymáshoz. Megállapítható, hogy bármelyik frekvenciát vizsgálva, azok szórása 1000Hz körüli értékre adódik, ami elhanyagolható a rezonancia frekvenciákhoz képest. Mivel ezen frekvenciák segítségével számoljuk ki a hidrodinamikai függvényt (lásd 5.4 Hidrodinamikai függvény alfejezet), a frekvenciák ekkora mértékű változása nem befolyásolja nagymértékben a $\Gamma(\omega)$ függvényt, általánosan igaz lesz bármely mikropipetta konzolra.

4.2.3. Anyagparaméter a frekvenciák szempontjából

A szilícium vagy szilícium-nitrid-ből készülő FluidFM konzolok geometriáját elektrokémiai- és fókuszált ionsugaras marással, valamint fotolitográfiával alakítják. Ezek fizikai tulajdonságaik eltérhetnek a hagyományos AFM konzolokétól, az előző fejezetekben már tárgyalt eltérések miatt. Egy alapvető fizikai tulajdonsága ezeknek a konzoloknak a rugalmassági vagy Young-modulus. Tömbi szilícium-nitrid Young-modulusa 250 GPa,

azonban a Cytosurge által FluidFM konzolokra megadott nominális rugalmassági modulus 310 GPa.

A Young-modulus pontos értékének bizonytalansága miatt fontosnak tartom, hogy vizsgáljam, miként változnak a konzolok rezonanciafrekvenciái Young-modulus függvényében. A vizsgálathoz egy 4 μm -es apertúrával rendelkező mikropipetta konzolt használtam, melyet (5.2.1. Mesh konvergencia a frekvenciák szempontjából alfejezet alapján) Finer mesh-el láttam el.

Az alábbi táblázat (7. táblázat) a különböző rugalmassági modulus értékek esetén számolt első- illetve második rezonanciafrekvenciákat tartalmazza, azokat levegőn és vizkózus közegben számolva.

7. táblázat Egy 4 μm -es apertúrával rendelkező konzol rezonanciafrekvenciáinak függése a konzol rugalmassági modulusának függvényében.

Young-modulus [GPa]	Első rez. frekvencia	Második rez. frekvencia	Első rez. frekvencia	Második rez. frekvencia
	@levegő [Hz]	@levegő [Hz]	@víz [Hz]	@víz [Hz]
250	70.953	209.790	24.282	150.530
270	73.737	217.900	25.235	156.440
290	76.418	225.590	26.153	162.130
310	79.009	234.170	27.040	167.620
330	81.522	240.230	27.898	172.950
350	83.953	250.580	28.731	178.110

A táblázat alapján látható, hogy a Young-modulus növelése a frekvencia növekedését eredményezi. A gyártó által névlegesnek meghatározott 310 GPa-hoz tartozó frekvenciaértékeket kísérleti módszerrel szeretném igazolni.

A további vizsgálatoknál a mesh sűrűségének megkötése mellett (Finer, 1.342.351 szabadsági fok), a konzol rugalmassági modulusának értékét a gyártó által közölt névleges értékre veszem (310 GPa).

4.2.4. A konzol körülvevő viszkózus közeg vizsgálata

FluidFM méréseket egyaránt végzünk levegőn és viszkózus közegben, továbbá a rugóállandó meghatározásának szempontjából is fontos tudni, hogy a különböző közegek milyen hatást fejtenek ki a konzolokra. Szimuláció során vizsgáltam, hogy a közeg térfogata, amelyben a FluidFM konzolok elhelyezkednek, miként befolyásolja a rezonanciafrekvenciákat.

A vizsgálatot ismét végrehajtottam levegő és víz közegben, amelytől azt várjuk, hogy a térfogat bizonyos növekedése után a számolt rezonanciafrekvenciák egy adott értékhez fognak konvergálni. A következő táblázat (8. táblázat) a különböző térfogatokban számolt frekvenciákat tartalmazza.

8. táblázat A konzolokat körülvevő közeg befolyásolja azoknak a rezonanciafrekvenciáját, így vizsgálni kell a térfogattól való függést.

Befoglaló térfogat [$\mu\text{m}^* \mu\text{m}^* \mu\text{m}$]	Első rez. frekvencia @levegő [Hz]	Második rez. frekvencia @levegő [Hz]	Első rez. frekvencia @víz [Hz]	Második rez. frekvencia @víz [Hz]
50*50*220	79.055	231.940	28.942	177.770
100*100*220	79.009	231.450	27.349	169.020
250*250*220	79.011	232.970	27.040	167.620
500*500*220	79.126	233.630	27.122	168.860

A táblázat alapján az látszik, hogy a térfogat növelésével a frekvenciák egy bizonyos pontig változnak, majd további növelése esetén, már csak nagyon kis szórással változnak.

4.3. Konzolok rezonanciafrekvenciáinak méréssel történő meghatározása

A szimuláció helyességét kísérleti módszerekkel is alá szeretném támasztani, így több-féle mérést végeztem konzolok frekvenciáinak megállapításához. Első lehetőségként a FluidFM BOT-ba épített szoftverrel próbáltam lemérni, azonban a beépített AD/DA átalakító 344 kHz-es maximális mintavételi frekvenciája miatt a spektrum sáv szélessége korlátozott lesz. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a konzol termikus zajspektrumát mérve 0 kHz és 172 kHz közötti sávban fognak komponensek megjelenni. Az első rezonancia csúcs helyét levegőn és vízben mérve, a második rezonancia csúcsot pedig csak vízben mérve tudjuk a mért spektrumról leolvasni.

További problémát jelent, hogy a FluidFM-ben általunk használt mikropipetta konzolok drágák, így igen csak korlátozott darabszám áll belőlük rendelkezésünkre. A kis mintaszám miatt ezekből a mérésekből messzemenő statisztikai következtetések nem vonhatók le, azonban lehetőség nyílik a szimulációval kiszámolt rezonanciafrekvenciák validálására és így alkalmazhatóvá válik a Payam-módszer a rugóállandó kiszámítására.

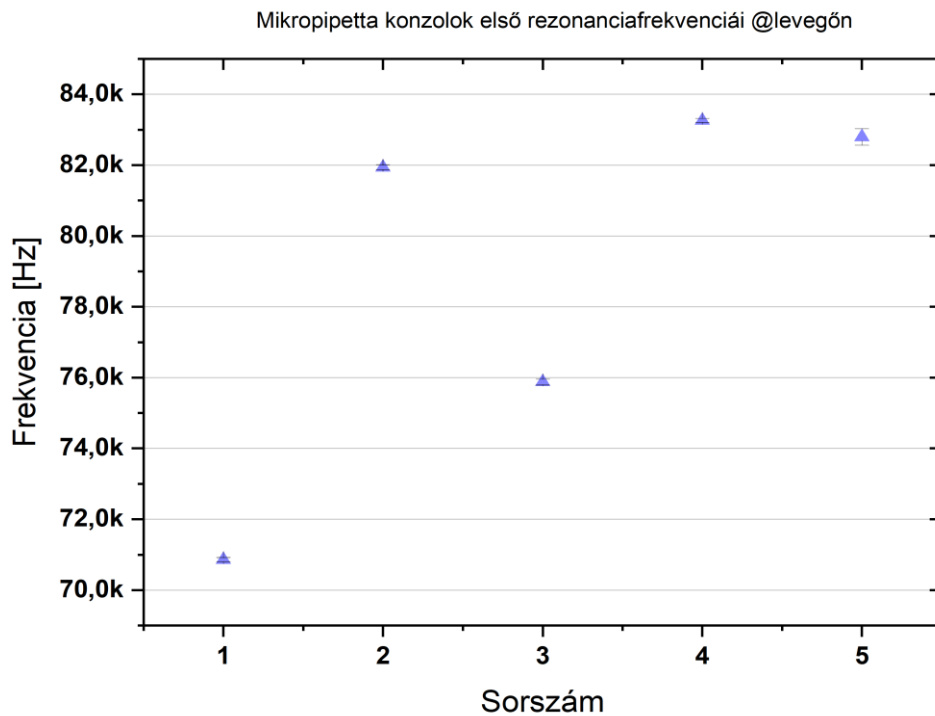
4.3.1. FluidFM-mel mért rezonanciafrekvenciák

A FluidFM a hagyományos AFM-hez hasonlóan a pozicionáló lézer segítségével határozza meg a konzolok rezonanciafrekvenciáját. A konzolokat meghajtás nélkül vizsgálva, annak termikus energiájából következő parányi rezgését mérve, majd a mért adatsort Fourier transzformálva a kapott spektrumon a rezonancia csúcsok helye leolvasható (13. ábra). Mivel a FluidFM digitalizáló áramkörének legnagyobb mintavételi frekvenciája egy erős korlátot ad, emiatt a spektrumban csak a 0 kHz és 172 kHz közötti tartományban jelennek meg harmonikusok. Ezen feltételek miatt a konzoloknak csak levegőn mért első, valamint vízben mért első és második rezonanciafrekvenciája mérhető.

A következő táblázatban (9. táblázat) négy különböző mikropipetta konzol (a 4-es és 5-ös sorszámú konzol azonos, két egymás követő napon használva) levegőn (14./A ábra) mért első frekvenciája található. A FluidFM szoftvere minden konzolnak tízszer méri meg a zajspektrumát, majd ezekre Lorentz-görbét illeszt, extrapolálja a kapott hangolási görbéket, melyek tartalmazzák a frekvencia és a félértékszélesség átlagát, amivel kiszámítja a rugóállandót. A megadott szórásértékek tíz darab mintára vannak megadva.

9. táblázat 8 μ m-es apertúrájú konzolokat mérve FluidFM-mel azoknak az első rezonanciafrekvenciája meghatározható levegőn.
FluidFM műszer minden konzolt tízszer mér le, majd ezeket átlagolja.

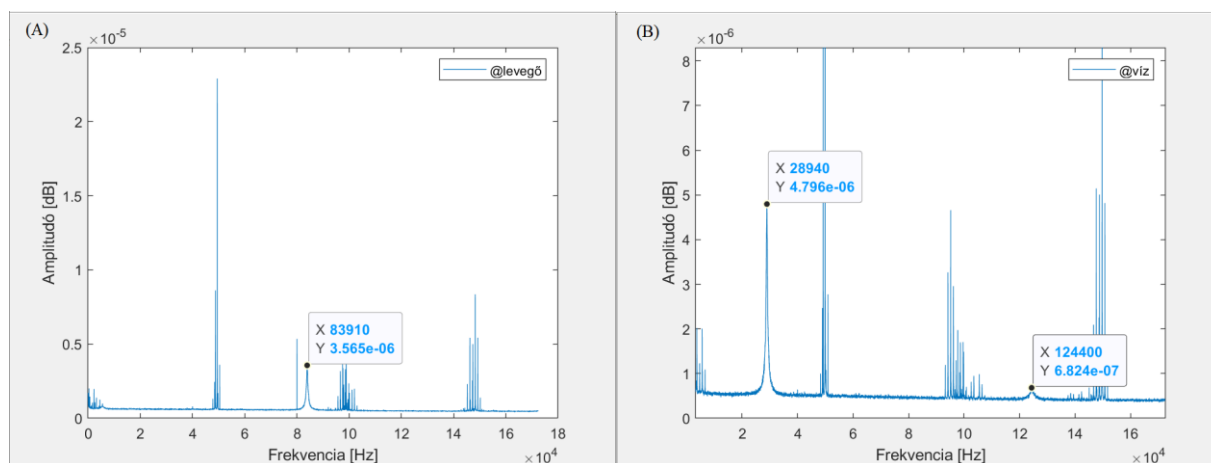
Sorszám	Apertúra	Dátum	Átlag rez. frekvencia [Hz]	Szórás [Hz]
1.	8 μ m	2018.01.30	70.858	59,03
2.	8 μ m	2019.09.30	81.935	70,43
3.	8 μ m	2019.10.07	75.877	81,38
4.	8 μ m	2019.10.10	83.260	59,44
5.	8 μ m	2019.10.11	82.796	235,29



13. ábra Mikropipetta konzolok első rezonanciafrekvenciái levegőn. A frekvenciák átlaga jelentősen eltérhet egymástól, a mért frekvenciák szórása viszont kicsi.

Megfigyelhető, hogy bár egyforma konzolok rezonanciafrekvenciáit mértük, a kapott átlag frekvenciák jelentősen eltérhetnek egymástól. Az eltérés nagy valószínűséggel gyártási technológiából adódik, a FluidFM a rezonancia csúcsok helyét nagy pontossággal képes mérni.

A végeelem-módszerrel számolt eredményekkel összehasonlítva megállapítható, hogy a konzolok valós rezonanciafrekvenciája azonos nagyságrendbe esik a számolt frekvenciákkal.

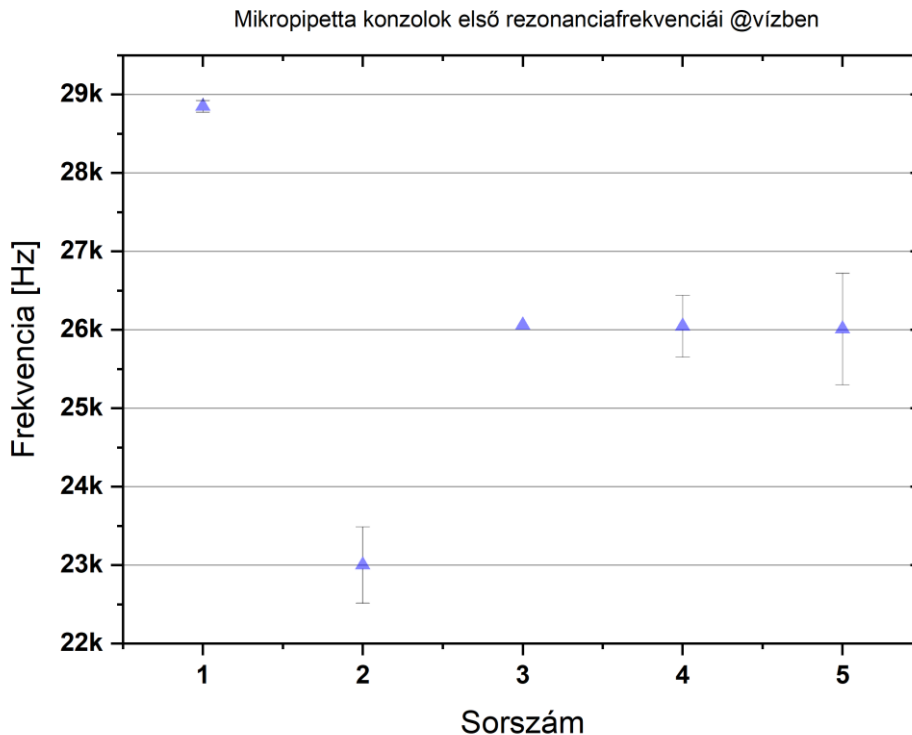


14. ábra (A) Levegőn és (B) vízben mért konzolok termikus zajspektruma.
A spektrumról leolvashatók a rezonancia csúcsok helyei.

Az előző táblázatnál (9. táblázat) említett okok miatt a vízben (14./B ábra) történt méréseknél is átlag frekvenciákról található információk. A konzolt tíz alkalommal mérve, majd a méréseket átlagolva az alábbi frekvenciákat kaptuk (10. táblázat).

10. táblázat $8\mu\text{m}$ konzolt FluidFM segítségével vízben mérve az első illetve második rezonanciafrekvenciák is megkaphatók, azonban a rossz jel-zaj viszony miatt több esetben nem láthatók.

Sorszám	Apertúra	Dátum	Átlag első rez. frekvencia [Hz]	Szórás [Hz]	Átlag második rez. frekvencia [Hz]	Szórás [Hz]
1.	$8\mu\text{m}$	2018.01.30	28.850	73,93	124.157	287,84
2.	$8\mu\text{m}$	2019.09.30	23.001	486,15	-	-
3.	$8\mu\text{m}$	2019.10.07	26.060	-	-	-
4.	$8\mu\text{m}$	2019.10.10	26.047	393,09	-	-
5.	$8\mu\text{m}$	2019.10.11	26.011	710,57	-	-



15. ábra Mikropipetta konzolok első rezonanciafrekvenciái vízben mérve. A frekvenciák átlaga ebben az esetben is eltérhet egymástól. A mért frekvenciák szórása viszkozus közegben nagyobbak bizonyult.

Az vízben mért rezonancia csúcsokról sajnos az a megállapítás tehető, hogy a FluidFM mikroszkóp a második csúcs helyét egy konzol kivételével nem tudta megmérni. Mivel a második csúcs helye még bőven a mintavételi szűrő előtti alul áteresztő szűrő átviteli sávjában található, meg kellene jelennie a megfelelő komponensnek, viszont a jel-zaj viszony annyira rossz volt, hogy a spektrumon már nem látszott.

A szimulált és mért első csúcsok helyei ebben az esetben is közel estek, szórásuk 2122 Hz volt. A második csúcs helyéről azonban nem tudok további megállapítást tenni értékek hiányában. Ha a FluidFM-et gyártó Cytosurge cég javít a mintavételező áramkörön, akkor a jobb jel-zaj viszony és remélhetőleg nagyobb mintavételi frekvenciából a statisztikai elemzés folytatható.

4.3.2. VEECO AFM-mel mért rezonanciafrekvenciák

A levegőn szimulált második rezonanciafrekvencia helyességét a BME-ETT laborban található VEECO AFM mikroszkóppal vizsgáltuk. Az AFM-be épített AD/DA mintavételi frekvenciája 800kHz, így a spektrumban azok a komponensek is megjelennek, melyeket már FluidFM BOT-műszerrel már nem tudtunk mérni.



16. ábra BME ETT laborjában található VEECO AFM-el mért FluidFM konzol zajspektruma levegő közegben mérve.

A FluidFM konzoljának termikus zajspektrumát levegőn mérve (16. ábra) a spektrum elején egy erős alapvonal eltolódás látható. Ez annak tudható be, hogy a FluidFM konzol-t tartó műanyag holder nem illeszkedik a VEECO AFM-be, a pozicionáló lézer így nem a konzol reflektív bevonatú felszínét éri, mely a lézer visszaverődését segíti, hanem valamilyen interferenciával jut csak a vissza a fotodetektorra.

Az első rezonanciafrekvencia helyességét az előző alfejezetben már tárgyaltam így, csak a második levegőn mért frekvenciát kerestük. A szimulációhoz egy 8 μ m-es apertúrájú mikropipetta konzolt (Finer, 1.342.351 szabadsági fok, 250*250*220-as térfogatban, 25°C-on), a fizikai méréshez pedig szintén egy 8 μ m-es apertúrájú konzol lett használva. A következő táblázat (11. táblázat) összehasonlítja a szimulált, valamint a FluidFM-mel mért második rezonanciafrekvenciákat.

11. táblázat COMSOL és a FluidFM által szolgáltatott rezonanciafrekvenciák összehasonlítása.

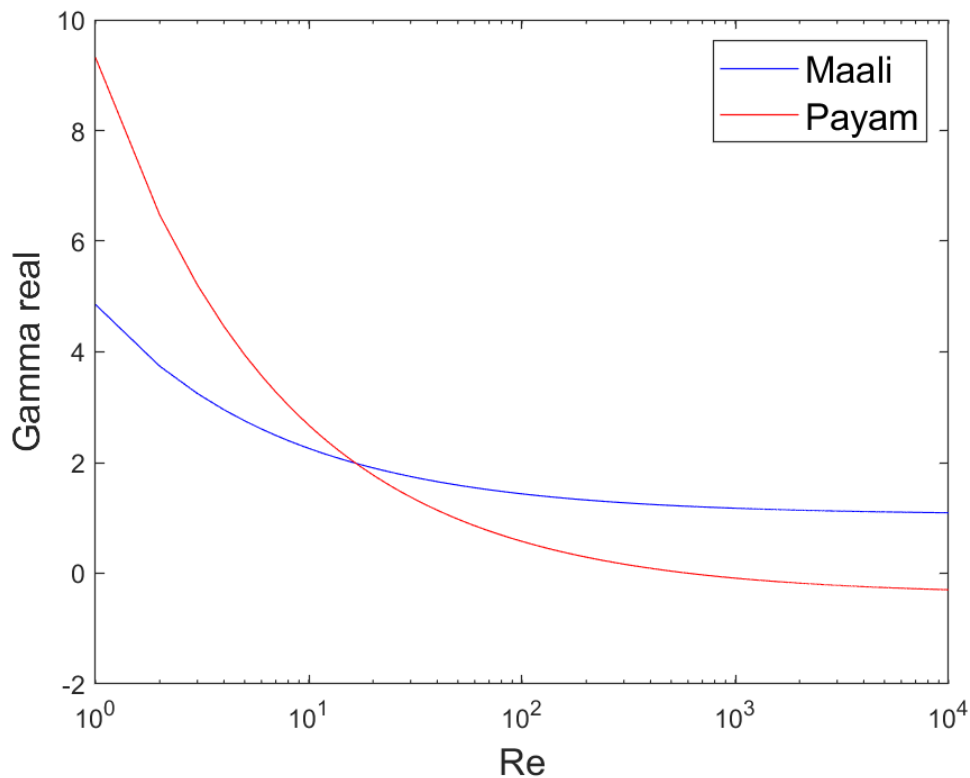
	Második rez. frekvencia [Hz]
COMSOL	232.970
FluidFM Probe	258.000

A második rezonanciafrekvencia eltér a szimulált és mért esetben, melyek a következők miatt lehetnek:

- FluidFM-mel való mérésekhez a konzolok csatornáját mindig feltöltjük folyadékkal, így AFM-mel való frekvenciamérésnél is. Azonban a feltöltés és a mérés között eltelt időben valamennyi folyadék elpárologhatott a konzolból,
- FluidFM konzolok gyártási technológiájának szórása szintén befolyásoló tényező lehet, a frekvenciák szempontjából,
- A szimuláció során valamely –egyelőre- ismeretlen tényező nem lett figyelembe véve.

4.4. Hidrodinamikai függvény

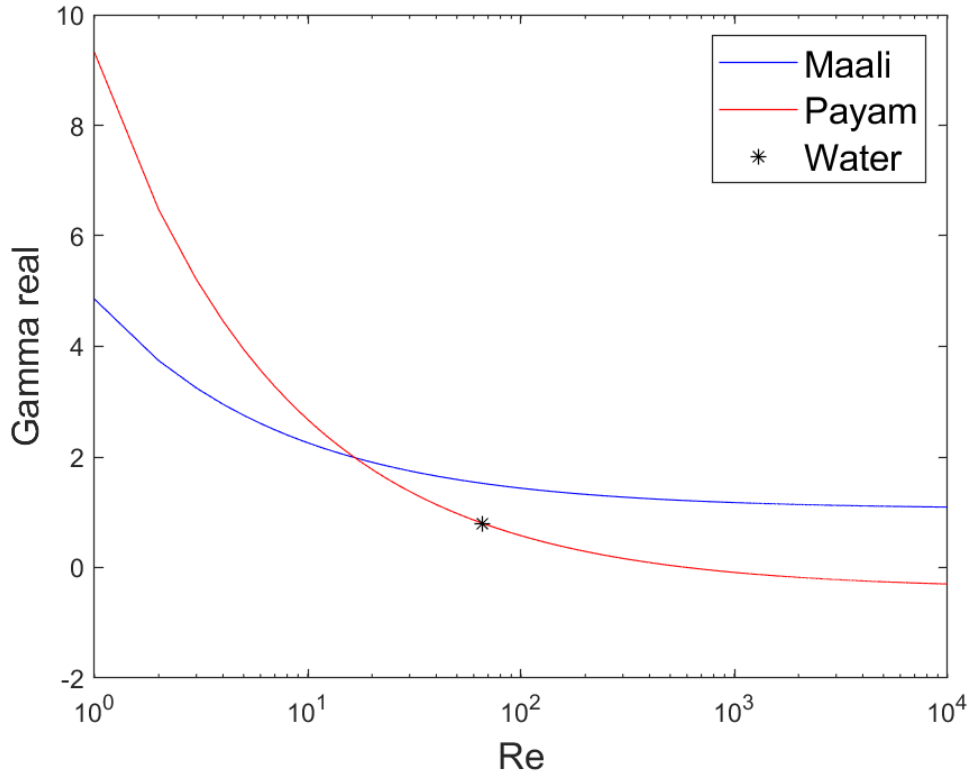
A konzol körüli viszkózus közeg dinamikáját a Navier-Stokes egyenlet adja meg. Mivel ennek zárt analitikai megoldása nem létezik, a gyakorlatban közelítő módszereket alkalmazunk. Sader 1998-ban publikált cikkében [5] megadott az akkoriban konvencionálisnak tartott négyzet alakú, tömör konzolokra egy $\Gamma(\omega)$ hidrodinamikai függvényt, mely a Navier-Stokes egyenlet egy speciális, ezekre az AFM konzolokra vonatkozó megoldása. Mivel a viszkózus közeg valamilyen csillapítást jelent a rendszerre, így ennek meghatározása kritikus. A $\Gamma(\omega)$ hidrodinamikai függvény felírására többféle közelítés használható. Payam 2018-as cikkében [10] közölte (2.6.4) egyenlete alapján, általános geometriájú konzolok levegőn, illetve viszkózus közegben mért első és második rezonanciafrekvenciái segítségével meghatározhatók a regressziós együtthatók. Ezek segítségével a (2.6.2) egyenletbe behelyettesítve pedig felírható a hidrodinamikai függvény.



17. ábra Hidrodinamikai függvény a Reynolds-szám logritmusának függvényében. Kék görbe az irodalomban elfogadott regressziós együtthatókkal [11] számolt, míg a piros (2.6.4) egyenlet alapján számolt regressziós együtthatókkal ábrázolt hidrodinamikai függvény.

FluidFM mikroszkóp beépített rugóállandó meghatározó modulja a Sader módszeren keresztül a Maali-ék [11] által meghatározott, végtelen hosszú, téglatest keresztmetszetű konzolokra értelmezett hidrodinamikai függvény regressziós állandóit használja (17. ábra). Ezek rendre $[a_1 = 1.0553; a_2 = 3.7997]$. Ezek az értékek tömör, hasáb alakú, a hosszúságukhoz képest elhanyagolhatóan vékony AFM konzolokra lettek meghatározva. A FluidFM mikropipetta konzolok azonban ettől jelentősen eltérnek, így joggal várhatunk eltérést a hidrodinamikai viselkedésükben is. A korábban leírtaknak megfelelően a konzolok levegőn és viszkozus közegben szimulációval (Finer mesh, 250*250*220-as térfogatban, 25°C-on) meghatározott első, illetve második rezonanciafrekvenciáit felhasználva kiszámoltam a (2.6.4) egyenlet alapján a konzolokat jellemző hidrodinamikai függvény regressziós együtthatóit. Ezek rendre $[a_1 = -0.4293; a_2 = 10.7022]$, melyek szignifikánsan eltérnek az eddig használt együtthatóktól. A (2.6.2) egyenletbe behelyettesítve Maali-ék és az új általam számolt együtthatókat ábrázoltam a hidrodinamikai függvényt a Reynolds-szám logaritmusának függvényében (17. ábra).

Érdekes ellenőrzésként megvizsgálni, hogy az így meghatározott hidrodinamikai függvény pontosan írja-e le a FluidFM mikropipetta konzolok viselkedését. Ehhez használjuk egy valódi konzol első rezonanciafrekvenciáját levegőn és vízben mérve (a FluidFM-mel).



18. ábra Hidrodinamikai függvény Maali-ék és Payam-ék módszere alapján meghatározott regressziós együtthatókkal. A csillag a konzol mért frekvenciával, a (4.4) egyenlettel számolt érték, mely pontosan illeszkedik az új általunk felírt hidrodinamikai függvényre

A mérést egy 8 μm -es apertúrájú mikropipetta konzollal végeztem, vízben (25°C-on). A kapott frekvenciákat behelyettesítve Maali-ék 2005-ös cikkében [11] található egyenletekből levezetett $\Gamma(\omega)$ függvénybe (4.4), az így meghatározott érték pontosan ráillik az új regressziós együtthatókkal felírt hidrodinamikai függvényre (18. ábra).

$$\Gamma_{real, Maali} = \frac{\rho_c L b h \left(\frac{\omega_a^2}{\omega_f^2} - 1 \right)}{\rho_f \frac{\pi}{4} b^2 L} \quad (4.4)$$

Ahol ρ_c a konzol sűrűsége, ρ_f a konzolt körülvevő folyadék sűrűsége, L, b, h a konzol hossza, szélessége, valamint a magassága, ω_f, ω_a a konzol rezonancia frekvenciája folyadékban, és levegőn mérve.

Ebből az a következtetés vonható le, hogy bár az általam meghatározott regressziós együtthatók jelentősen eltérnek az AFM konzolokra használt és elfogadott együtthatóktól, az ezekkel számolt hidrodinamikai függvény pontosan írja le a konzol viselkedését vízben. A hidrodinamikai függvény szélesebb tartományon történő ellenőrzéséhez a jövőben különböző, ismert viszkozitású közegekben lenne szükséges megismételni a méréseket.

4.5. A két módszer összehasonlítása

Miután minden szükséges paramétert meghatároztam a Payam-módszer alkalmazásához, összehasonlítottam a Sader- és Payam-módszerekkel számolt konzol rugóállandóját. Payamék által adott módszer lényege tehát, hogy ha a konzolnak ismerjük a hidrodinamikai függvényét, akkor a rugóállandó a konzol első levegőn, illetve vízben mért rezonanciafrekvenciájából számolható.

A következő táblázatban (12. táblázat) az előző alfejezetben (4.3.1 FluidFM-mel mért rezonanciafrekvenciák) bemutatott konzolok rezonanciafrekvenciái, illetve ezekből a FluidFM szoftvere által a Sader-módszer segítségével számolt és az általunk Payam-módszerrel számolt rugóállandók láthatóak.

12. táblázat A különböző tűk Sader, valamint Payam-módszerével számolt rugóállandó értékek összehasonlítása.

Sorszám	Dátum	Első frekvencia @levegő, [Hz]	Első frekvencia @víz, [Hz]	Sader-módszerrel számolt k [N/m]	Payam-módszerrel számolt k [N/m]
1	2018.01.30	70.858	28.850	0,14	2,64
2	2019.09.30	81.935	23.001	1,38	1,70
3	2019.10.07	75.877	26.047	1,5	2,14
4	2019.10.10	83.260	26.047	2,23	2,09
5	2019.10.11	82.796	26.011	1,11	2,09

A Sader-módszerrel meghatározott rugóállandó értékek ingadozása megkérdőjelezi a módszer alkalmazhatóságát. A Payam-módszerrel ugyan ezekre a konzolokra számolt rugóállandó értékek ingadozása jóval kisebb. Az 1-es sorszámú konzol Sader-módszerrel számolt rugóállandójának értéke feltehetően további mérési hibával terhelt. A 4-es, illetve 5-ös sorszámú konzolt egymás követő napon használva, azonos körülmények között a Sader-módszer két merőben eltérő rugóállandót hozott ki, míg Payam-módszer csak a harmadik tizedesben tér el. Ez azt jelenti, hogy a FluidFM azon alkalmazási területein, ahol a rugóállandó értéke kritikus, nagymértékben befolyásolná a mérést, mint például az erőspektroszkópia, ott a mérésbe vitt szórás jelentősen csökkenthető.

4.6. A Payam-módszer alkalmazhatóságának további tesztelése

Az MTA EK MFA Nanobioszenzorika Laboratóriumában folyó sejtadhéziós mérések egy kritikus pontja a rugóállandó pontos meghatározása. Ahogy az előző fejezetben bemutattam, hogy a különböző módszerekkel számolt rugóállandó értékek mennyivel eltérhetnek egymástól, most annak alkalmazásán keresztül be szeretném mutatni, milyen eltérést okoz adhéziómérés közben.

Belső konzulensem, Nagy Ágoston Gábor által VERO sejtvonalon végzett sejtadhéziós mérését utólagosan értékeltem ki. A mérések a 4-es és 5-ös sorszámú 8 µm-es apertúrájú, $2 \frac{N}{m}$ nominális rugóállandójú mikropipetta konzollal történtek (4.3.1 FluidFM-mel mért rezonanciafrekvenciák alfejezetben).

13. táblázat Sader- és Payam-módszer összehasonlítása sejtadhézió mérésen keresztül.

Sorszám	Dátum	Adhéziós erő [nN] (Sader-módszer)	Adhéziós erő [nN] (Payam-módszer)
1	2019.10.10	473,64	445,64
2	2019.10.10	453,35	426,5
3	2019.10.11	222,3	422,93
4	2019.10.11	389,7	732,5

A táblázat (13. táblázat) két egymást követő napon ugyanazzal a konzollal végzett mérés erőspektroszkópiás eredményeit mutatja be nN-ban kifejezve, Sader illetve Payam módszerére vonatkoztatva.

A sejtadhéziós erő egymáshoz képesti eltérése sok paramétertől függ, például függ az adott sejttől, valamint a felülettől. Érdekes megfigyelés azonban, hogy Sader valamint Payam módszerével meghatározott rugóállandó esetén mért adhéziós erők maximuma durván eltérhetnek egymáshoz képest. Míg 2019.10.10-én végzett sejtadhéziós kísérleteknél a rugóállandók eltérése csak $0,132 \left[\frac{N}{m}\right]$, a 2019.10.11-én ugyanannak a mikropipetta konzolnak a rugóállandójának eltérése majdnem $1 \left[\frac{N}{m}\right]$. Így tehát kijelenthető, hogy a rugóállandó minél precízebb meghatározása létfontosságú a FluidFM-mel végzett erőspektroszkópiához.

Az eddig FluidFM-el végzett sejtadhéziós mérések és publikációkban közöl adhéziós erők, valamint adhéziós energiák helyessége megkérdőjelezhető, hiszen a rugóállandó kalibrálását a műszer a Sader-módszer segítségével végezte.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám elsődleges célja egy módszer alkalmazhatóságának kidolgozása és tesztelése volt, amely segítségével megbízhatóan kalibrálható FluidFM mikropipetta típusú konzolok rugóállandója. Megmutattam, hogy az AFM-es alkalmazásoknál elterjedten használt Sader-módszer alkalmazása FluidFM konzolok esetén jelentős hibát visz a kalibrációba, aminek elsődleges oka, hogy a módszer a konzol rezonanciafrekvenciája mellett annak jósági tényezőjével is számol, és utóbbi meghatározása kifejezetten érzékeny a méréseket terhelő zajra. Céлом egy új, Payamék által 2018-ban publikált módszer tesztelése volt, amely a jósági tényezőt kiküszöbölve, pusztán a levegőn és vízben mért rezonanciafrekvenciák segítségével teszi lehetővé a rugóállandó meghatározását.

Payam és Sader módszerének alkalmazásához is szükséges ismerni a FluidFM konzolok viszkózus közegekben mutatott viselkedését leíró ú.n. hidrodinamikai függvényét. Mivel a Sader-módszerhez az AFM-es gyakorlatban elterjedten használt hidrodinamikai függvényt tömör hasábokra vezették le – és ettől a FluidFM konzolok felépítése jelentősen eltér – felmerült a hidrodinamikai függvény érvényességének vizsgálata is. Payamék munkáját felhasználva kidolgoztunk egy módszert a FluidFM konzolok hidrodinamikai függvényének (pontosabban az azt leíró regressziós együtthatóknak) a meghatározására.

Ehhez modellalkotás és szimulációk segítségével felépítettem a FluidFM mikropipetta konzolok pontos geometriai modelljét, majd meghatároztam levegőn és vízben a konzolok első két rezonanciafrekvenciáját. Vizsgáltam a szimulációhoz használt térháló konvergenciáját, illetve az anyagparaméterek és a konzolt körülvevő térfogat hatásait is. A kapott eredményeket valódi mikropipetta konzolokon mért rezonanciafrekvenciákkal validáltam.

A szimulációkból meghatározott rezonanciafrekvenciák segítségével felírtam a FluidFM konzolok hidrodinamikai függvényét, valamint Payam módszeréből meghatároztam valódi konzolok rugóállandóit, pusztán a rezonanciafrekvenciájuk mérésén keresztül. Összehasonlítva a FluidFM berendezésben implementált Sader-módszerrel úgy találtam, hogy az általam implementált, Payam-által kidolgozott módszer jelentősen kisebb hibával és megbízhatóbban teszi lehetővé FluidFM konzolok rugóállandójának kalibrálását.

A jövőben az implementált módszer tesztelése után célunk az eredmények rangos nemzetközi folyóiratban történő közzélése is.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Bonyár Attilának** a kitartó és lelkes segítséget, szakmai tanácsokat, valamint az iránymutatást, amivel munkámat segítette.

Szeretném megköszönni konzulensemnek **Nagy Ágoston Gábornak** a rengeteg segítséget, tanácsot, lelkesítést.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Hajnal Zoltánnak**, hogy fáradhatatlan lelkesedéssel segített a végeselem szimulációban.

Szeretném továbbá megköszönni az MTA EK MFA Nanobioszenzorika csoport vezetőjének **Dr. Horváth Róbertnek**, aki lehetőséget teremtett a FluidFM BOT műszer használatára, valamint biztosította a dolgozat elkészüléséhez az anyagi háttérrel.

Köszönettel tartozom **Szalai József** magyartanárnak, aki a dolgozat nyelvhelyességi lektorálását végezte.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] A. Saftics, B. Türk, A. Sulyok, A. Nagy, T. Gerecsei, I. Szekacs, S. Kurunczi és R. Horváth, „Biomimetic Dextran-Based Hydrogel Layers for Cell Micropatterning over Large Areas Using the FluidFM BOT Technology,” *Langmuir*, 2019.
- [2] A. Bonyár, Szerző, *Mikroszkópiás módszerek*. [Performance]. 2017.
- [3] G. Binnig, C. F. Quate és C. Gerber, „Atomic Force Microscope,” *PHYS. REV. LETT.*, 1986.
- [4] D. Haviland és V. Korenivski, „Nanostructure Physics,” [Online]. Available: http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/fast-scan/bruker-help/Content/Resources/Graphics/Training%20Guide/Force_distance_inAFM.png.
- [5] J. E. Sader, „Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope,” *AIP of Physics*, 1998.
- [6] D. S. Pablo, „Manipulating cells and colloids,” 2013.
- [7] Á. G. Nagy, J. Kámán, R. Horváth és A. Bonyár, „Spring constant and sensitivity calibration of FluidFM micropipette cantilevers for force spectroscopy measurements,” 2019.
- [8] J. Helenius, C. P. Heisenberg, H. E. Gaub és D. J. Muller, „Single-cell force spectroscopy,” *Journal of Cell Science*, 2008.
- [9] J. E. Sader, J. W. M. Chon és P. Mulvaney, „Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers,” *AIP*, 1999.
- [10] A. F. Payam, W. Trewby és K. Voitchovsky, „Determining the spring constant of arbitrarily shaped cantilevers in viscous environments,” *AOI of Physics*, 2018.
- [11] A. Maali, C. Hurth, R. Boisgard, C. Jai, T. C. Bouchacina és J. P. Aimé, „Hydrodynamics of oscillating atomic force microscopy cantilevers in viscous fluids,” *AIP*, 2005.