



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar

Elektronikus Eszközök Tanszéke

Nanostrukturált felületek és fehérjék kölcsönhatása

TDK DOLGOZAT

Készítette

Fritz Enikő

Egészségügyi Mérnök hallgató

Konzulensek

Dr. Pongrácz Anita

Ender Ferenc

MTA EK MFA

BME EET

Budapest

2015. október 26.

Tartalomjegyzék

Összefoglaló	3
Abstract	4
Bevezetés	5
Háttérismeretek összefoglalása	7
Az idegszövet reakciója implantátum behelyezésére.....	7
A fehérjék szerepe a sejtek tapadásában	8
Felületek nedvesítési tulajdonságai és hatásuk a fehérjék tapadására.....	10
Kísérleti módszerek.....	11
Kontakt szög mérés.....	11
Fluoreszcens mikroszkópia	14
Pásztázó elektronmikroszkópia és az atomerő – mikroszkóp	15
Mintakészítés	16
A vizsgált chip.....	16
<i>In vitro</i> sejttenyésztés	17
Eredmények	18
A vizsgált minták	19
A felületi topográfia jellemzése	21
Kontakt szög mérés.....	23
A vizsgált minták kontakt szög értékei.....	24
Black Si nedvesítési modellje	27
Kontakt szög változások HSA fehérjeréteg hatására	33
A fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok eredményei	34
<i>In vitro</i> vizsgálatok eredményei	35
Konklúzió.....	37
További tervek	38
Köszönetnyilvánítás	39
Irodalomjegyzék.....	40

Összefoglaló

TDK munkámmal a központi idegrendszerbe ültethető sokcsatornás szilícium alapú mikroelektródok fejlesztésébe kapcsolódtam be a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpont, Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetében. A dolgozatban ismertetett eredmények ahhoz a kutatási célkitűzéshez kapcsolódnak, melyek a mikroelektródok biokompatibilitását kívánják javítani.

Az implantátumok fejlesztésekor kiemelt figyelmet kell fordítani az eszköz felületi tulajdonságaira, mivel ezeken a pontokon közvetlenül érintkezik a test szöveteivel és az itt kialakuló környezet nagymértékben befolyásolja a műszer további működését, használhatóságát. A beültetés során az idegszövetek károsodást szenvednek, az idegen test behelyezése pedig aktiválja az immunrendszer egyes elemeit, így végső soron az idő előrehaladtával a szenzor körül egy szigetelő réteg alakul ki (ez a *gliózis* jelensége), mely jelentősen rontja a jelek detektálhatóságát.

Kutatások igazolták, hogy az implantátum felületek mikro -és nano méretű topográfiájának megváltoztatásával befolyásolható az eszközök biokompatibilitása. Célunk olyan nanotopográfiájú felület tervezése, melyen megfelelő módon tudjuk befolyásolni a különböző idegszöveti sejtek viselkedését, késleltetni tudjuk a *gliális heg* képződését. Mivel a sejtek közötti kommunikáció a sejt közötti térbe történő különböző fehérjék kibocsátása, illetve érzékelése révén valósul meg, így nanotopográfiák és fehérjék kölcsönhatását vizsgáltam első lépésként.

Eszközfejlesztési szempontból fontos paraméter, hogy a nanostruktúrált eljárás beilleszthető legyen az agyi elektródák mikrotechnológiai megmunkálási sorába.

Dolgozatomban *kriogén plazmamarással* előállított nanostruktúrált Si és Pt felületeken vizsgáltam modell fehérjék tapadási tulajdonságait kontakt szög méréssel és fluoreszcens mikroszkópiával. Az MTA KOKI Molekuláris és Fejlődésneurobiológia Osztályával közösen végzett kísérletekben idegi őssejtek tapadását és differenciálódását vizsgáltam ugyanezek a felületeken és hasonlítottam össze a modell fehérjék viselkedésével.

Mivel a felületek vizsgálata egyidejűleg több oldalról történt (biológiai és mérnöki szempontok figyelembevételével egyaránt), így reményeink szerint komplexebb képet kaphatunk a szenzorokhoz felhasználható alapanyagok tulajdonságairól, mely jelentősen megkönnyítheti a további fejlesztéseket.

Abstract

Several attempts have been made to improve the long term biocompatibility of bionic interfaces implanted in the central nervous system to minimize glial scar formation. Micro and nano-scaled topography of the implant surface was shown to influence the behaviour of the surrounding tissue on the cellular level. Our goal is to design and fabricate nanostructured surfaces to hinder gliosis and promote neural attachment and regeneration. Nanostructuring techniques should be compatible with the existing MEMS process flow of micromachined neural interfaces.

Since the communication between the cells is achieved by perceiving and emitting various proteins to the extracellular matrix, thus I analyze the interactions of nano-topographies and proteins as a first step.

In my thesis I examined the adhesion properties of model proteins on nanostructured Si and Pt surfaces formed by cryogenic plasma etching. Contact angle measurements, fluorescent microscopy and scanning electron microscopy were used to characterize the different surfaces.

In vitro neural stem cell viability tests on different surfaces were carried out in MTA KOKI, Department of Developmental Neurobiology. Results of the protein and cell attachment experiments were compared from biological and engineering point of view as well in order to get a more complex road map for future bionic interface development.

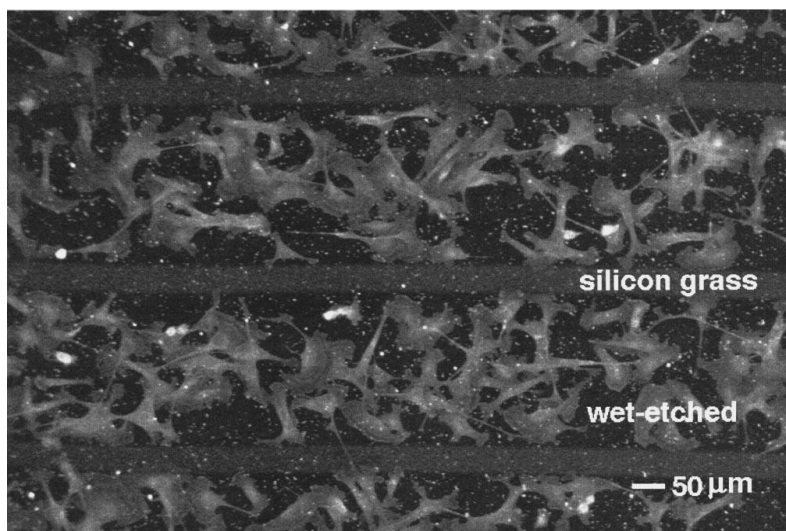
Bevezetés

TDK munkám során idegszövetbe ültethető mikro-elektromechanikus rendszereken (MEMS) alapuló érzékelők fejlesztésébe nyerhettem betekintést a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpont, Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetének Mikrotechnológia Laborjában.

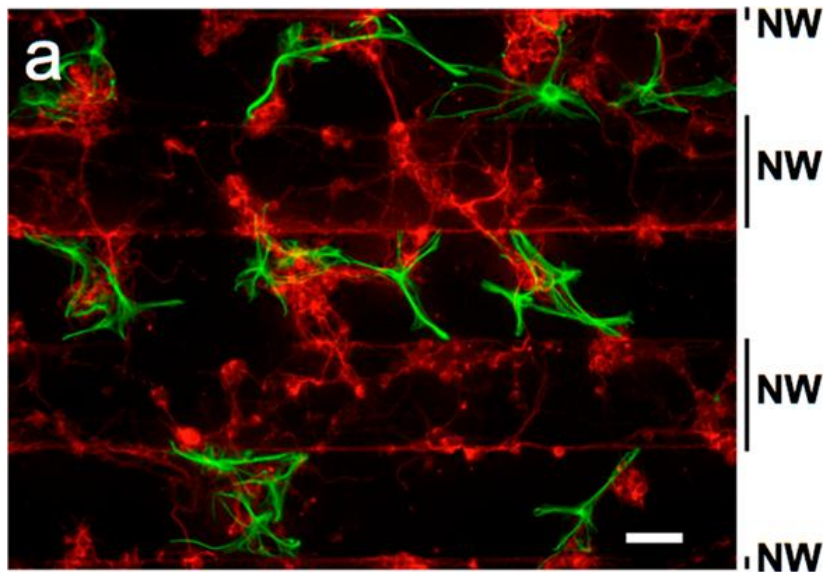
Ahhoz, hogy pontosabban megismerhessük a központi idegrendszer működését, olyan eszközökre van szükség, melyek az idegszövetbe ültetve a szervezettel biokompatibilisek, minél kisebb méretűek, s a célterületre juttatva a szövetet a legkisebb mértékben károsítják [1]. Ezek a feltételei annak, hogy a neurális működést meg lehessen figyelni, ennek azonban még napjainkban is számos korlát szab határt.

Az egyik ilyen korlátozó tényező, hogy a szonda behelyezése során még a legkörültekintőbb eljárások mellett is károsodik az idegszövet, hiszen azokon a pontokon, ahol az idegen eszköz befúródik, a sejtek sérülnek/elpusztulhatnak [2]. Az események következtében pedig gátolt az újabb neurális szinapszisok kialakulása. Ennek következtében az immunrendszer aktiválódik, melynek eredményei a beültetett test körüli gyulladás, az elektród kilökődése, illetve az elektród körüli gliasejtekből kialakuló szigetelő burok keletkezése lehetnek. Az előbbi folyamatok pedig mind megnehezítik, adott esetben ellehetetlenítik az idegrendszeri sejttes aktivitás hosszú távú *in vivo* megfigyelését [2].

Arra vonatkozóan, hogy ezeket a hatásokat elkerüljük, illetve minimalizáljuk, az elmúlt évtizedekben már számos elképzelés született. A jelek érzékelését a nagyobb fajlagos felületű, alacsonyabb impedanciájú elektródok alkalmazásán túl az is elősegítheti, hogy a megfelelő mérettartományú struktúra kedvezőbb közeget biztosíthat az idegsejtek regenerációja számára. [2],[3],[4] Amennyiben egy ilyen felület mentén az elektromosan szigetelő hatású gliális hegyszövet nem vagy kisebb mértékben alakul ki, úgy az a hosszútávú biokompatibilitás növelését jelentené.



1. ábra. Pásztázó konfokális mikroszkóppal készített felvétel LRM55-ös asztrocita sejtekről. A sejtek jobban tapadnak a maratott felszínű régiókhöz (sötétebb), mint a szilícium „mezőkhöz” (világosabb) [2]



2. ábra: Retina sejt sejt kultúrák 100/100-as sűrűségű szubsztráton. (100 μm -nyi struktúrátlan felszínét 100 μm -nyi nanoszálakkal tarkított felszín vált.) A neuronok (piros színűek) és a gliasejtek (zöld színűek) a különböző topográfiájú felszíneken különböző mértékben találhatóak. A nanoszálas (NW) felszín a neuronok elkerülik. Mérték: 50 μm [5]

In vitro vizsgálatok terén már vannak biztató eredmények a sejtek tapadását illetően [2]. LRM55 immortalizált asztrocita sejt vonalból származó sejtek hat órás inkubációs idő eltelté után szembetűnően jobban preferálták a nedves maratással készült nanostrukturált szilícium felületeket, mint a sima felszínű „szilícium mezőket” [2]. A kísérletek alapján azt állapították meg, hogy az asztrociták tapadását a felület textúrájának a 100 nm alatti tartományban lévő mintázata segíti a legjobban [2]. Ez annak tudható be, hogy az ilyen nagyságrendű mintázatok hasonlítanak az extracelluláris mátrixra, amivel a sejtek interakcióba kerülnek [6].

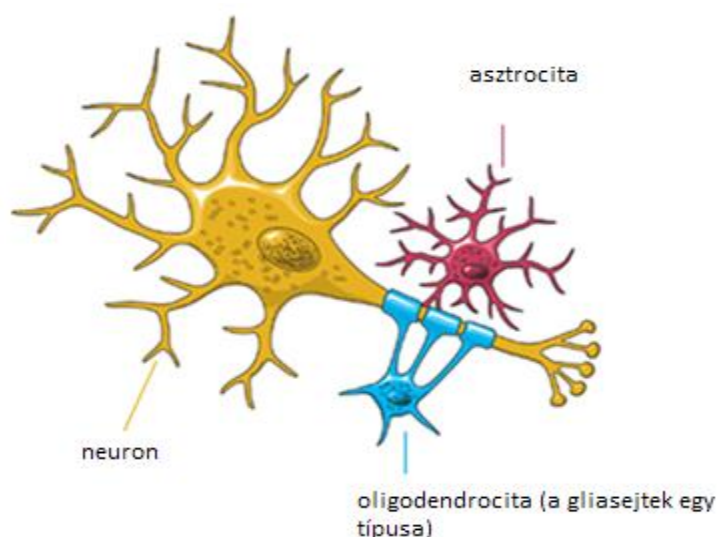
Egy másik kísérletben a látóideg neuronjait és gliákat figyeltek meg gallium-foszfid (GaP) szubsztráton [5]. Megkülönböztettek sima és GaP-ból készült nanoszálas felületeket. A két felület típus 100 μm -es régióként követte egymást. Azt tapasztalták, hogy 8 nappal a kultúra kiültetése után a glia sejtek csak a sima felületeken voltak jelen, míg neuronok a sima és a nanoszálakkal borított felszínen is (2. ábra). A jelenség azonban változott, ha a nanostrukturált és sima felületek egymáshoz képesti arányát változtatták. [5]

Célunk tehát egy olyan felületi topológia megtalálása, amely környezetében a reaktív gliózis csökkenthető, míg a neuronális regeneráció támogatott. Ezt a szakirodalmi adatok alapján az eszköz felületének fizikai, illetve kémiai tulajdonságainak megváltoztatásával el lehetne érni. A dolgozat keretein belül idegszövetbe ültethető mikroelektród felületeken vizsgáltam biológiai anyagok tapadási tulajdonságait. Kémiai és fizikai tulajdonságuk függvényében elemeztem rajtuk egy modell fehérje tapadási tulajdonságait. A kapott eredményeket összehasonlítottam *in vitro* sejt kultúrák viselkedésével.

Háttérismeretek összefoglalása

Az idegszövet reakciója implantátum behelyezésére

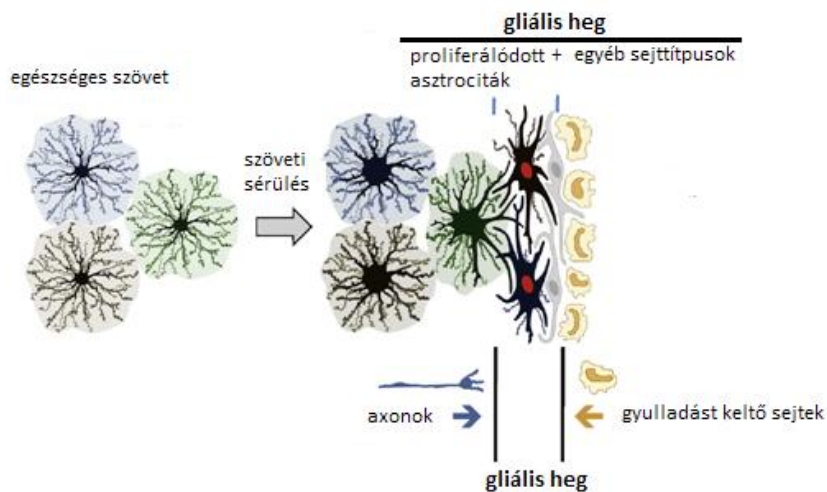
Ahhoz, hogy az idegszövetbe ültethető eszközök működése pontosan szabályozható legyen, fontos megismerni az idegszövet felépítését és működését. Testünkben a legnagyobb sejtdiverzitás az idegszövet sejttypusaira jellemző [7]. A különféle típusok száma meghaladja a százat, de alapvetően kétféle sejttypust különböztethetünk meg: az elektromos jeleket fogadó és továbbító neuronokat és a köréjük épülő támasztó- vagy gliasejteket [8]. A teljes kép azonban nagyon komplex, ma is intenzíven kutatott terület az agyműködés teljes megértése. A gliasejtek is változatos morfológiájú és működésű sejtek, egyik típusuk az asztrociták, vagy csillag alakú sejtek. Az asztrociták nélkülözhetetlenek a központi idegrendszer normális működéséhez, a reaktív asztrociták pedig a szöveti sérülés, vagy betegség hatására adott válaszban rendkívül fontos szerepet töltenek be.



3. ábra: sematikus ábra a neuronok és a gliasejtek kapcsolatáról [8]

Egy tüelettroda idegrendszerbe helyezése során számolnunk kell a gliózis kialakulásával. Mivel a neurobiológusok az idegsejtekből mérhető elektromos jelek nagysága, eloszlása, illetve időbeli lefutása alapján következtetnek az idegszövet állapotára, és anatómiai viszonyaira, így a hosszútávú *in vivo* alkalmazás során az implantátum körül kialakuló, gliasejtekből álló szigetelőrétteg zavarja a jelek megfelelő detektálását. A gliasejtekből álló réteg a behelyezés alatti behatások - szöveti sérülések, gyulladós folyamatok - miatt alakul ki, ilyenkor az asztrociták aktiválódnak. A reaktív asztrogliózist a gliális heg követi, amiben újonnan proliferálódtak sejtek is részt vesznek, melyeket az egészséges szövetben nem láthatunk. A folyamatok következtében a neuronok elhalnak, mely negatívan befolyásolja az idegi aktivitás vizsgálatát.

Célunk, hogy egy nem reaktív asztrocita szőnyeg alakuljon ki az eszköz felületén, ami elősegíti a neuronok regenerálódását az implantátum közvetlen közelében.



4. ábra: Sematikus ábra az asztroglióziszról gliális heggel. A gliális hegképződés általában szöveti sérülések, és gyulladások hatására alakul ki. A gliális heg magában foglalja az újonnan képződött asztrocitákat (az ábrán piros sejtmaggal szerepelnek), egyéb sejtípusokat (az ábrán szürke sejtmaggal láthatóak), mint például a fibro meningeális sejtek, és egyéb gliatípusok. A kifejlődött gliális heg esetében az asztrociták már nem különülnek külön tartományokra, a nyúlványaik átfedőek. A gliális heg hosszú időn keresztül fennáll, és a szövetben gátként funkcionál. Nem csak az axonok számára jelent gátat, hanem a gyulladásos folyamatokat előidéző sejteket is elkülöníti, így megvédi a szomszédos ép szöveteket az erős gyulladástól. [2]

A fehérjék szerepe a sejtek tapadásában

A sejtek letapadása egy alapvető biológiai mechanizmus. Ennek segítségével nyílik lehetőség többsejtű szervezetek szerveződésére, szövetfejlődésre, a sejtek migrációjára és túlélésükre [9]. *In vivo* a sejtek adhezív környezetét az extracelluláris mátrix molekulái, a szomszédos sejtek felszíne és egyes oldható faktorok nyújtják. Ezeket egyaránt szállíthatják a szöveti sejtek és a vérkeringés is [9]. Egy implantátum beültetése során a behelyezett eszköz felületére spontán módon fehérjék adszorbeálódnak. Így egy fehérjeréteg alakul ki, amit a felület tulajdonságai befolyásolnak. Ez a fehérjeréteg pedig a sejtek tapadásáért felelős, mivel a sejtek felszínén lévő receptorokhoz kötődik [6].

A legtöbb sejtípusnak tehát szüksége van egy szilárd aljzatra ahhoz, hogy további életműködései fennmaradhassanak (ez alól kivételt képeznek a vér és a szövetközi nedvek egyes sejtípusai).

A tapadás folyamata lényegében a következőképpen történik.

1. A sejtek a membránjuk külső felszínén lévő receptorok segítségével érzékelik az extracelluláris mátrix egyes molekuláit. Az egyes receptorok kulcs-zár mechanizmus módjára specifikusan egy, vagy csak egy pár féle molekulát ismernek fel.
2. A felismerést követően az adott célmolekula megkötődik a receptorokon. Ezek a molekulák jellemzően fehérje természetű anyagok, így a felismerést bizonyos aminosav szekvenciák illetve szekvencia részletek segítik.
3. A megkötés hatására az adott molekulára jellemző változások indukálódnak a sejtben.

Az extracelluláris mátrix (ECM – extracellular matrix) egy rétegelt, nem élő biológiai anyag, a sejtek közötti teret tölti ki [10]. Az ECM-et alaphártyák veszik körbe (membrana basalisok). Az ECM fő alkotóeleme a kollagén, mely egy hosszú, fonalas strukturális fehérje. Ezen kívül fontos még megemlíteni a laminin, illetve a fibronectin fehérjéket is, melyek szintén jellemzően az ECM-ben fordulnak elő, és részt vehetnek a sejtek adhéziós folyamataiban is.

Sejt adhéziós molekula	Jellemzők
Cadherinekek	Transzmembrán glikoproteincsaládba tartoznak. Működésükhöz Ca^{2+} -ion szükséges, segítségével összetartják a sejteket.
Ig - szupercsalád (ezen belül N-CAM)	Glikoproteinek. Neuronok és gliák expresszálják, fő szerepük a sejt-sejt adhézió. A molekuláknak sztiálsav oldalláncai vannak, ha ezek leválnak, akkor a sejtek képesek egymással kapcsolódni. Ezen kívül sejt-mátrix adhéziót, és neuritnövekedést is előidézhettek.
Integrinek	Az ECM-hoz kötődő sejt felszíni receptorok. Működésükhöz szükség van Ca^{2+} vagy Mg^{2+} jelenlétére. Fibronectinhez, lamininhoz, vagy kollagénhez is képesek kötődni.
Szelektinek	A szomszédos sejtek szénhidrátcsoportjaihoz kötődnek. A Ca^{2+} -függő kötésben a lektin domén vesz részt

1. táblázat: A sejtek felszínén lévő adhéziós molekulák főbb típusai, és jellemzőik [11],[12]

Mivel a natív adhéziós anyagok pontos molekuláris környezete még tisztázatlan, ezért *in vitro* sejtenyésztési eljárások során mesterségesen előállított fehérjéket használnak. Ezeknek nagy előnye, hogy viszonylag olcsók, könnyen reprodukálhatók, és kémiaiailag jól meghatározott csoportokat tartalmaznak [9].

Az egyik ilyen elterjedt anyag a poly-L-lizin, melyet *in-vitro* kísérleteink során felhasználtunk. A fluoreszcens mikroszkópos mérésekhez pedig humán szérumalbumin (HSA) fehérjét használtunk.

A szérum albumin a vérplazma fő fehérjéje, jól kötődik hozzá a víz, Ca^{2+} , Na^{2+} , K^{+} , egyes zsírsavak, hormonok, a bilirubin, és egyes gyógyszerhatóanyagok is [13]. Fő funkciója a vér kolloidális ozmotikus nyomásának szabályozása. Ez a fehérje a plazma fő cink transzportere, az ott található cink mintegy 80%-át az albumin köti meg [13]. Ezen kívül még rendkívül szerteágazó tulajdonságai vannak, számos életfolyamat nélkülözhetetlen fehérjéje. Az eddigi vizsgálatok alapján azt állapították meg, hogy hidrofób molekuláris részletekhez/felületekhez képes nem specifikusan kötődni. [14]

Kísérleteinkben egy speciális HSA (humán szérum albumin) fehérjével dolgoztunk, mely egy több lépéses folyamat végeredményeképpen fluoreszcens fehérjével van összekötve, így

fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz is kitűnően lehet alkalmazni. Ez a fluoreszcens fehérje a fluorescein, melyet a mikroszkópok FITC szűrőjével lehet detektálni [15].

Vizsgálatainkhoz azért a HSA fehérjét választottuk, mert az *in vitro* kísérletekhez használt poly-L-lizint fluoreszcens változatban sajnos nem lehet kapni. Emellett azonban a mi



fehérjénk is jó modellfehérjének bizonyul az általam elvégzett vizsgálatok során, mivel mindkét fehérje nagyságrendileg hasonló mérettartományban helyezkedik el, ezen kívül pedig az őket felépítő aminosavak sem ellentétes kémiai tulajdonságúak [16].

5. ábra: A humán szérum albumin fehérje modellje [17]

Felületek nedvesítési tulajdonságai és hatásuk a fehérjék tapadására

A fehérjeadszorpció (tehát a fehérjék felszínre tapadása) vizsgálata manapság nagy jelentőséggel bír, és széles körben vizsgált jelenség, hiszen részben ennek megértése által nyílik lehetőségünk új anyagok fejlesztésére. Számos eljárás létezik ennek vizsgálatára, de viszonylag kevés kvantitatív közülük [18], [19].

Egy tanulmány flourometriás vizsgálatokat végzett, szarvasmarha fibrinogén és albumin fehérjék tapadását mérték különböző típusú felületeken, melyek egymással ellentétes kémiai tulajdonságokkal rendelkeztek [18]. Hidrofób, hidrofil, illetve szuperhidrofób és szuperhidrofil anyagokat vizsgáltak. Egyenetlen felszín esetén számos nehézség adódik, számos technikát nem lehet alkalmazni ebben az esetben fehérje tapadás vizsgálatára, mivel az egyenetlenségek közé be is szorulhatnak a fehérjék, nem tudjuk pontosan, hogy mennyire fedik le a bonyolult topológiájú felszín, pontos mennyiségüket nehéz megmérni. A tanulmányban különféle módszereket alkalmaztak, majd ezeket hasonlították össze, és azt találták, hogy a tendenciák mindenhol hasonlóak voltak.

- Az albuminhoz képest nagyobb mennyiségű fibrinogén adszorbeálódik hasonló kémiai felületeken.
- Mindkét fehérje nagyobb affinitással kötődik a hidrofób felszínhez, ezekben az esetekben azonban kevesebb fehérje tapadt ki. Ez azt jelentheti, hogy a hidrofób felületek nagyobb deformációt indukálhatnak az adszorbeálódó fehérjemolekulákban.
- Hidrofil felületek esetén azt tapasztalták, hogy nagyobb mennyiségű fibrinogén tapadt a felszínre, mint hidrofób esetekben.
- Szuperhidrofil felszínknél mindkét fehérje felületi sűrűsége meglepően alacsony volt, ezzel ellentétben a szuperhidrofób felületeknél nagy mennyiségű fehérjét mértek [18].

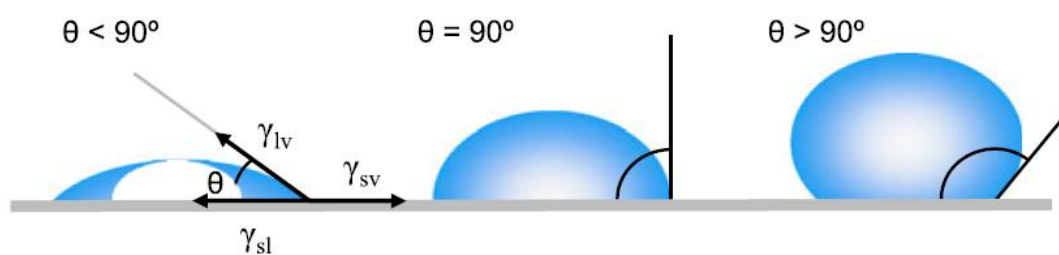
Kísérleti módszerek

Kontakt szög mérés

A kontakt szög jelentősége, meghatározása

Adott folyadékokból képződött cseppek szilárd, sík felületen különböző alakot vehetnek fel: a felület és a csepp felületének érintője által bezárt szöget az anyagi tulajdonságok befolyásolhatják. Ha ugyanolyan folyadékból (pl. desztillált vízből) cseppentünk különböző anyagú és/vagy struktúrájú szilárd felületekre, egy adott felületi tulajdonságokkal rendelkező mintán a cseppek alakja mindig hasonló lesz. A különböző tulajdonságú mintákon viszont a cseppek eltérő alakot vesznek fel, így a csepp alakjából lehet következtetni a felület tulajdonságaira.

Ezek a különbségek a határfelületi viselkedésből adódnak. Ha lecseppentjük a folyadékot a szilárd felszínre, akkor szilárd – folyadék, szilárd – gáz (a mérőhely légtere), és gáz – folyadék határfelületekről beszélhetünk. Ennek megfelelően a három határfelülethez tartozó felületi feszültségekről is. A felületek határfelületén megjelenő *felületi feszültség* ($\gamma = [N/m]$) egy új felület létrehozásához szükséges munkával és a felület hányadosával egyenlő [20] A 6. ábrán is jelzett θ szög (*peremszög* vagy *kontakt szög*), a felületi feszültségek függvényében változik, ami szorosan összefügg a szilárd felület anyagi minőségével, érdességével, így ezzel a számmal jól lehet jellemezni egy adott felület nedvesíthetőségét (illetve egy adott folyadék nedvesítő képességét).



6. ábra: Rajz sima, homogén, szilárd felszínen lévő cseppekről, és kontakt szögeikről(θ). Ha $\theta < 90^\circ$, a felület jól nedvesíthető, ha $\theta > 90^\circ$, a felület rosszul nedvesíthető.

Jelölések: γ_{lv} : folyadék-gáz határfelület, γ_{sv} : szilárd-gáz határfelület, γ_{sl} : szilárd-folyadék határfelületen fellépő felületi feszültség [20]

A csepp alakja attól függ, hogy milyen a szilárd test felülete, mert a folyadékcsepp arra törekszik, hogy a felületi szabadenergiája a legalacsonyabb legyen.

Először *Thomas Young* írta le 1805-ben, hogy a peremszög a három felület felületi feszültségétől függ, így az utókor róla nevezte el az alábbi egyenletet:

$$\gamma_{lv} \cdot \cos\theta_Y = \gamma_{sv} \cdot \gamma_{sl}$$

A Young törvény kiterjesztése a *Laplace-törvény*, más néven *Young-Laplace egyenlet*, ami megadja az összefüggést a felületre cseppentett csepp alakja, és a külseje illetve a belseje közötti nyomáskülönbség közti összefüggést:

$$\Delta P = P_0 - P_1 = P_g = \gamma \cdot \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}$$

A kapott nyomásértéket *Laplace-nyomásnak* (ΔP), illetve *görbületi nyomásnak* (P_g) is nevezik. Az egyenletből látszik, hogy mindig ahhoz az oldalhoz tartozik nagyobb nyomásérték, amerre görbül a csepp (P_0). A képletben lévő R értékek pedig a vizsgált cseppek görbületi sugarát jelentik.

Kontakt szög meghatározás strukturált felületek esetén

A strukturált felületek nedvesítési viszonyainak meghatározása bonyolultabb feladat, mivel az anyagi minőség mellett a topográfia is jelentős szerepet játszik.

Strukturált felületek esetén érdemes megadni az ún. *egyenetlenségi hányadost* (*roughness factor, r*), mely a teljes felület, és ennek síkvetületének az arányát mutatja meg [21]. Mivel ez egy arányszám, nincs mértékegysége, értéke bármilyen pozitív számot felvehet.

Ha a felületre cseppentett víz (ill. egyéb folyadék) a felületi egyenetlenségek közé is bekerül, akkor a nyugalmi kontakt szöget az alábbi egyenlet alapján lehet meghatározni:

$$\cos\theta_W = r \cdot \cos\theta_0$$

Ekkor a rendszer egy új nyugalmi állapotba kerül, melyet *Wenzel-állapotnak* neveznek. (Az egyenletben bal oldalon a számított kontakt szög (θ_W) koszinusza szerepel, jobb oldalon pedig az eredeti nyugalmi kontakt szög koszinusza (θ_0) szorozva az egyenetlenség mérőszámával).

Amennyiben a csepp nem folyik be teljesen a struktúra elemek közé, hanem a víz (vagy egyéb folyadék) és a szilárd felület közé légnemű közeg (levegő) is kerül, akkor az új nyugalmi állapotot (más néven *Cassie*, vagy *Cassie-Baxter állapotot*) a következőképpen lehet meghatározni:

A teljes határfelületet felosztjuk szilárd – folyékony, illetve folyékony – légnemű határfelületekre (a képletben f_1 és f_2), majd az ezekhez tartozó nyugalmi kontakt szögek értékeit összegezzük:

$$\cos\theta_C = \cos\theta_1 \cdot f_1 + \cos\theta_2 \cdot f_2$$

A határfelületek nagysága a folyadékcsepp behatolási mélységének, és a felület topológiájának függvényében határozható meg. $f=[\mu\text{m}^2]$

Az 7. ábrán szemléletesen látható a két modell közti különbség. Ránézésre azt azonban nem egyszerű megállapítani, hogy a rendszer melyik állapotban van, hiszen nem látunk a felületi elemek közé.



7. ábra: A Wenzel és a Cassie állapotban lévő cseppek sematikus ábrája [22]

Ahhoz, hogy megállapíthassuk, hogy melyik állapot áll fenn, a következő egyenlet által meghatározott kritikus kontakt szög értéke segít ennek megítélésében:

$$\cos\theta_i = \frac{f - 1}{r - f}$$

A képletben az adott határfelülethez tartozó f felületi értékek szerepelnek. Ha a mért kontakt szög a kritikus kontakt szög feletti, akkor Cassie állapotról beszélünk, a kritikus kontakt szög alatt pedig Wenzel nedvesítésről [23].

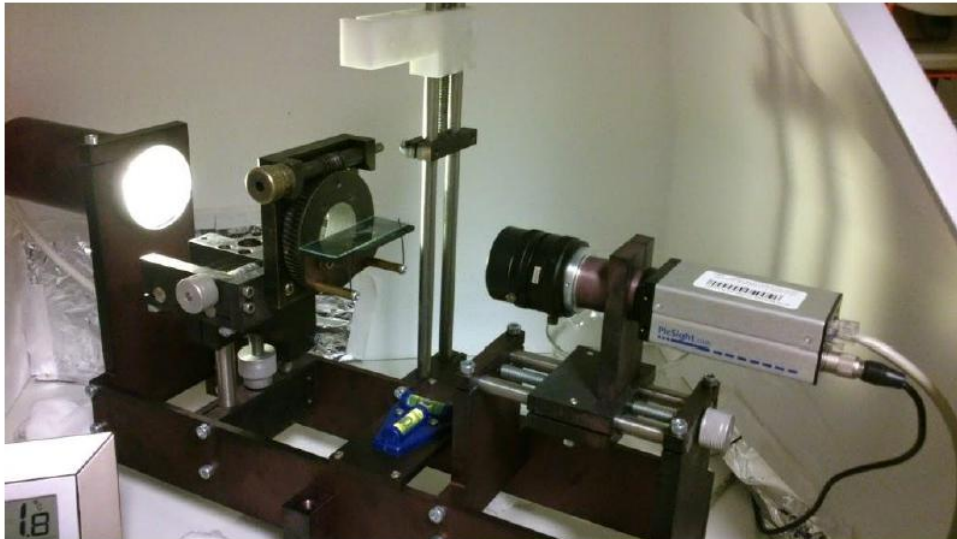
A kontakt szög mérése

A vizsgálatokat az MTA MFA tisztalaborjában végeztem egy speciálisan erre a feladatra kialakított mérőhelyen.

A mintákat tárgylemezre téve hátulról meg kell világítani, szemből pedig egy kamera segítségével lehet képeket rögzíteni. A tárgylemez és a kamera is elmozdítható a tér mindhárom irányában kis csavarok segítségével a megfelelő fókusztávolság beállításához. A műszer alján vízmértékek találhatóak, így az asztallap illetve a padló egyenletlenségeit is kiküszöbölhetjük.

Mivel kis felületű cseppekkel dolgoztam, a nagy felület térfogat arány révén a párolgás hatása a mérés ideje alatt nem hanyagolható el, így a mérés során erre különösen oda kell figyelni. Ezért az egész mérőműszer egy műanyag dobozban van, amire rá lehet csukni egy plexi tetőt. Nem zár hermetikusan, ahhoz azonban elegendő, hogy a doboz belsejében megnöveljük a páratartalmat, így a párolgás hatása tűrhető mértékűre csökkenthető. Épp ezért a mérések előtt mindig be kell a mérőhelyet nedvesíteni, és megvárni, amíg megnő a páratartalom. Ennek ellenőrzésére a dobozon belül egy hő- és páratartalom mérőt helyeztünk el.

A kamera össze van kötve egy számítógéppel, és a kamerához tartozó program segítségével jelenítjük meg a monitoron a képet, illetve elmentjük a frissen cseppentett vízről (vagy egyéb anyagról) készült képeket.



8. ábra: A kontakt szög mérő berendezés az MTA MFA laborjában

Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópia segítségével a különböző festési eljárásoknak alávetett sejtek vagy sejtorganellumok szelektíven és igen nagy érzékenységgel láthatóvá válnak. Az érzékenység olyan nagy, hogy megfelelő kötési eljárás hatására egyes molekulákat is láthatóvá tehetünk, ennek köszönhetően a modern biológiai tudományokban ez a módszer mára rendkívül elterjedté vált.



9. ábra: Fluoreszcens mikroszkóp, melynek típusa megegyezik a laborban használttal. [24]

A fluoreszcens mikroszkópia a fluoreszcencia jelenségén alapszik. Ennek során egy atomot, vagy molekulát, ha átmenetileg gerjesztett állapotba hozunk (nagyenergiájú, kis hullámhosszú fényvel világítjuk meg), akkor az, hogy visszajusson az eredeti állapotába, fényt

fog kibocsájtani (a megvilágításnál nagyobb hullámhosszúságú fényt). Ezt a kisugárzott fényt tudjuk detektálni. Ez az egész folyamat egy nanoszekundumon belül játszódik le. [25]

Egyes anyagok önmagukban is fluoreszcens tulajdonsággal bírnak, ezt a képességet autofluoreszcenciának hívjuk.

A fluoreszcenciára képes molekulákat fluorokrómoknak nevezzük. Ezeknek a molekuláknak közös sajátosságuk, hogy delokalizált elektronrendszerük van, így képesek a speciális emisszióra.

Mivel a kibocsájtott fény hullámhossza eltér a fényforrás hullámhosszától, ezért a keletkezett kép csak az adott struktúrát tartalmazza, így ennek részletes vizsgálatára nyílik lehetőség. Ha különböző festékekkel különböző struktúrákat (pl. egyes sejtorganellumokat) festünk, akkor ezeket külön-külön, de akár párhuzamosan is vizsgálhatjuk. A vizsgálatot a különböző szűrők alkalmazása teszi lehetővé. A szűrőkön csak a kívánt hullámhossz tartományból halad át a fény. Ezt mindig a festési eljárás során alkalmazott fluorofórok alapján kell megválasztani, hogy csak a fluorofór által emittált fény váljon láthatóvá a mikroszkópban. A legelterjedtebb szűrők a Dapi és a FITC szűrők, vizsgálataink során mi is ezeket használtuk.

Fényforrásként xenon vagy higanygőz lámpát használnak, az újabb eszközöknél pedig – mint amilyen az MFA laborjában lévő is – LEDes megvilágítást. [25]

Pásztázó elektronmikroszkópia és az atomerő – mikroszkóp

A pásztázó (scanning) elektronmikroszkópia (SEM) nagy előnye, hogy a megtekinteni kívánt mintát a fénymikroszkóp felbontóképességénél legalább egy nagyságrenddel jobb felbontásban vizsgálhatjuk. A kapott kép a minta felszínét, annak topológiáját nagy mélység élességgel ábrázolja. A technika alapelve, hogy a tárgy felszínét egy elektronnalábbal végigpásztázzák (innen ered az elnevezés is). Az elektronnaláb által gerjesztett felületközeli térből sugárzott és reflektált elektronokat egy érzékeny detektor fogja fel, és a detektor jel amplitúdóját kétdimenziós ernyőn ábrázolják.

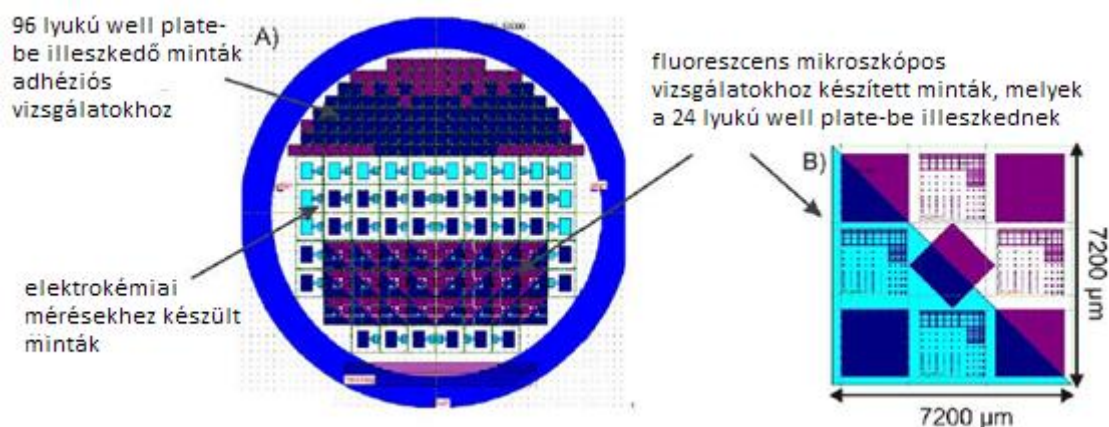
A pásztázó atomerő mikroszkópia (AFM) működési elve a SEM-hez hasonlóan a felület pásztázásán alapul. Előnye, hogy ennek segítségével bármilyen szilárd anyag vizsgálható, nem szükséges, hogy az anyag elektromosan vezető legyen. Ez különösen előnyös biológiai minták esetében. A működés lényege, hogy mikromegmunkálással egy közel atomi méretre „kihegyezett” vékony tűvel végigtapogatjuk a minta felszínét. A műszerben a tű egy mikrokonzolra van felfüggesztve. A konzol elhajlása lézernyaláb segítségével mérhető. Az érzékenység olyan nagy, hogy a tű és a minta közötti atomi kölcsönhatások is mérhetőek. Így ha a minta felszínén egy domborzati elemhez érünk, akkor a tű a nem fúródik a mintába, csupán atomi távolságban megközelíti. Ezeket az elhajlásokat detektálva és összeillette megkaphatjuk a vizsgált objektum felszíni viszonyait [26].

Mintakészítés

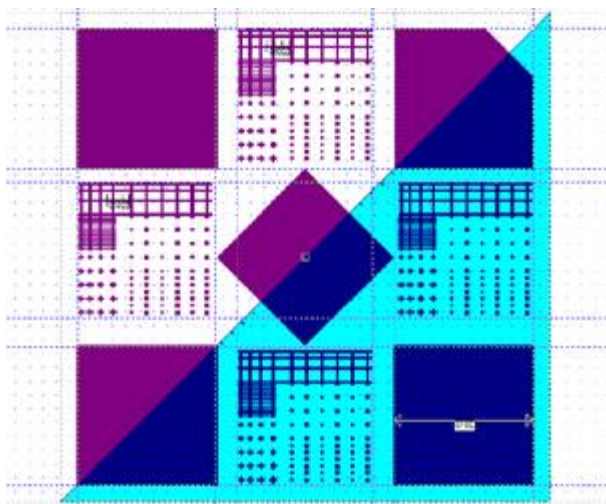
A vizsgált chip

A vizsgálni kívánt mintákat az MTA EK MFA Mikrotechnológiai laborjában készítették el. Először egy 4"-es (100) orientációjú egykristályos szilícium (a továbbiakban Si szelet) lapra 500 nm vastag termikus oxidréteget növesztettek. Ezt követően 1000 nm vastag poly-Si réteget választottak le alacsony nyomású kémiai gőzfázisú leválasztással (LPCVD - *Low-pressure Chemical Vapor Deposition*). A strukturált felszínre jellemző mikro-mintázatot fotolitográfias eljárással készítették, és a mintából kimarták. A nanostruktúra kialakítása kriogén hőmérsékleten zajló nagy sűrűségű plazma marással történt [27]. Miután kialakult a nanostrukturált felület (fekete szilícium), erre a felszínre platinát választottak le, melyet lift-off eljárással mikrostrukturáltak [27].

Végeredményben olyan téglalapok készülnek el, melyek pont beleillenek a 24 lyukú well plate-be, amiben a sejttapadási vizsgálatokat végezzük.



10. ábra: A különböző felhasználásra szánt szilíciumlapok gyártási elrendeződése. A B) jelű ábra az általunk használt mintát mutatja



11. ábra:

Az előző B) ábra nagyobb méretben. Szilícium lapka mintázatának képe a fluoreszcens mikroszkópiás kísérletekhez. A halványkék szín a platinázott felületeket jelöli, lilával a fekete szilícium részeket láthatjuk (platina nélkül), a sötétkék területek pedig a platinával borított fekete szilícium területek.

***In vitro* sejtenyésztés**

Vizsgálataink során az MTA KOKI Molekuláris és Fejlődésneurobiológia Osztályának munkatársaival közösen figyeltük meg, hogy az egyes felületek felszíne (mind kémiai mind fizikai szempontból) miként segíti elő a sejtek felszínre tapadását.

Ennek érdekében strukturált szilícium lapkákon végeztük a vizsgálatokat. Figyelemmel kísértük a még differenciálatlan sejtek viselkedését (4 órás és 24 órás inkubációs idő múlva), ezen kívül pedig retinsavval indukáltuk a sejteket, hogy differenciálódjanak a mintákon, és ezek felületi preferenciáit is megfigyeltük [28].

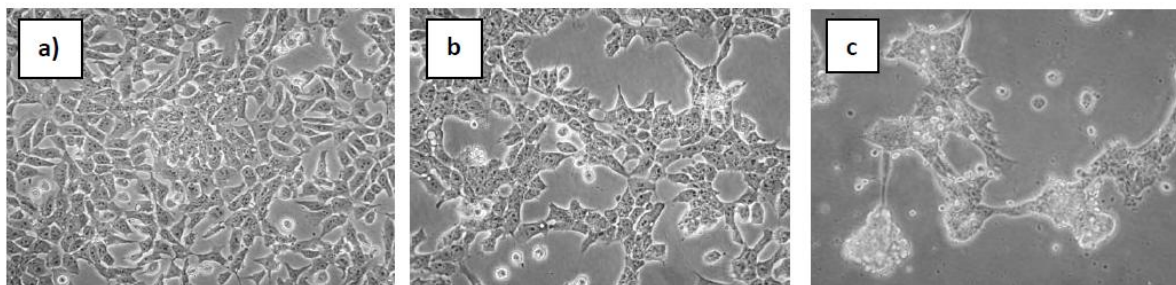
A méréseket az MTA KOKI laborjában tenyésztett NE-4C sejt vonal sejtjein végeztük.

Az NE-4C sejtekből primer agyi sejtenyészeteket állíthatunk elő [29]. Ezek a sejtek 9 napos transzgenikus egér embriók elő és középagyi vezikulumaiból származnak. A tenyészetek a p53-at, mely az egyik meghatározó tumorszupresszor fehérje, nem expresszálják. A sejtek normális tenyésztési körülmények között folyamatosan osztódnak, és az idegi őssejtekre jellemző sajátosságokat mutatják.

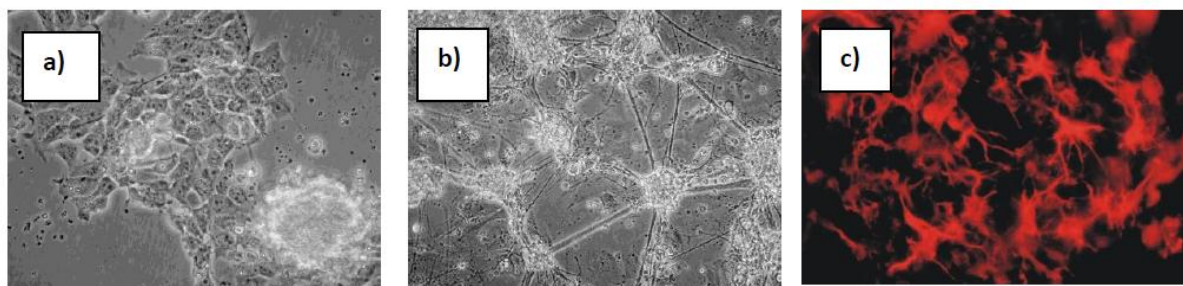
All-transz retinsav hatására (RA) azonban neuronokra és asztrocitákra differenciálódnak. A differenciálódás folyamatát jól elkülöníthető stádiumokra lehet bontani az eltérő morfológia, valamint a különböző molekuláris, illetve élettani hatások alapján.

Az egész folyamat 9-10 napot vesz igénybe a retinsavas kezelést követően, és 6 stádiumra bonthatjuk.

Az alábbiakban az egyes stádiumok közben készített felvételek láthatóak:



12. ábra: A retinsavas kezelés hatására létrejövő differenciálódás első három stádiuma. **a) ábra:** 1. stádium. A még nem indukált sejtekre jellemző állapot. **b) ábra:** 2. stádium. Morfológiai változások még nem figyelhetők meg. **c) ábra:** 3. stádium: Aggregátum képződés [29]



13. ábra: A differenciálódás további stádiumai. **a) ábra:** 4. stádium. A neuronális elváltozás időszaka. A kép a kezelést követő 5. napon készült. **b) ábra:** 5. stádium. Neuronális érés. A retinsav adagolása után 9 nappal a sejtek már jól fejlett axonokkal rendelkeznek. **c) ábra:** 6. stádium. A retinsavas indukciót követő 11. napon látható állapot. Az NE-4C sejtekből differenciálódott GFP+ asztrociták figyelhetők meg [29]

Eredmények

Vizsgálataim során az alábbi vizsgálatoknak vettem alá az 1. táblázatban összefoglalt mintáimat:

1. Alapfelületek nedvesítési tulajdonságai.

Jellemeztem a mintafelületeket a nedvesítési tulajdonságok alapján, mivel ezek a paraméterek szorosan összefügghetnek az elektródok szöveten belüli viselkedésével. A jellemzéshez kontakt szög méréseket végeztem, a kapott eredményekből pedig kiszámítottam a black-Si felületekhez tartozó nedvesítési tulajdonságokat.

2. HSA modell fehérje tapadásának vizsgálata a különböző felületeken

Az idegszövetbe helyezett érzékelő felületén egy fehérje réteg alakul ki először, amely hatással van a környező sejtek viselkedésére. Megvizsgáltam, hogy a különböző tulajdonságú felületeken tapadnak-e ki fehérjék. Kontakt szög mérésekkel igazoltam a felszínre tapadt fluoreszcens humán szérumalbumin fehérje (HSA) jelenlétét. Ugyanezeket a mintákat fluoreszcens mikroszkóp segítségével is jellemeztem.

3. *In vitro* idegi őssejtek viselkedése a különböző felületeken

Az MTA KOKI kutatócsoportjával közösen végzett *in vitro* vizsgálatok során a különböző felületeken differenciáltatott idegi őssejtek tapadását elemeztük.

A vizsgált minták

Az alábbi táblázatban a vizsgált minták rétegszerkezetét és felületi érdességét foglaltam össze:

Minta elnevezése	Rétegszerkezet	Jellemzői	Topográfia jellemzői
Si	Si	sima felszínű (atomi simaságú) egykristály szilíciumlap	atomi simaságú, a felszíni egyenetlenségek 0.1 nm alattiak [30]
polySi	Si/SiO ₂ /poly-Si	polikristályos szilíciumlap	a felszín egyenetlen, akár 200 nmes felszíni egyenetlenségek, függ a szemcsemérettől (15. ábra)
bSi	Si/blackSi	egykristály szilíciumlapból készült nanostrukturált (fekete) szilícium	a felszín Si oszlopok borítják, akár 15 µm-es magassággal (14. ábra)
bpSi	Si/SiO ₂ /black poly-Si	poliszilíciumból készült fekete szilícium	a felszín hegyes szilíciumoszlopok borítják, maximális magasságuk 700-800 µm
SiO ₂	Si/SiO ₂	szilícium-dioxid	Közel atomi simaságú
Pt	Si/SiO ₂ /Pt	platina	polikristályos Pt, 20 nm-es szemcseméret
PolySi_30nm_pt	Si/SiO ₂ /poly-Si/TiOx/Pt	polikristályos szilícium 30 nm vastag platinaréteggel a tetején	a felszín egyenetlen, 100-200 nmes felszíni egyenetlenségek
PolySi_100nm_Pt	Si/SiO ₂ /poly-Si/TiOx/Pt	polikristályos szilícium 100 nm vastag platinaréteggel a tetején	a felszín egyenetlen, 100- 200 nmes felszíni egyenetlenségek
bpSi_30nm_Pt	Si/SiO ₂ /black poly-Si/TiOx/Pt	fekete polyszilícium 30 nm vastag platinaréteggel a tetején	Max 1000 nm magas, 200-300 nm széles, legömbölyített tetejű, oszlopos szerkezet
bpSi_100nm_Pt	Si/SiO ₂ /black poly-Si/TiOx/Pt	fekete polyszilícium 100 nm vastag platinaréteggel a tetején	Max 1000 nm magas, 200-300 nm széles, legömbölyített tetejű, oszlopos szerkezet (16. ábra)
bSi+HSA	Si/blackSi/HSA	HSA oldatban inkubált egykristályos fekete szilícium	a felszín Si oszlopok borítják, akár akár 15 µm-es magassággal
bSi+Pt+HSA	Si/blackSi/TiOx/Pt/HSA	HSA oldatban inkubált platínával bevont egykristályos	a felszín legömbölyített Si oszlopok borítják, akár 15 µm-es magassággal

		fekete szilícium	
polySi+HSA	Si/SiO ₂ /poly-Si/HSA	HSA oldatban inkubált poliszilícium	a felszín egyenetlen, akár 200 nm-es felszíni egyenetlenségek
polySi+Pt+HSA	Si/SiO ₂ /poly-Si/TiOx/Pt /HSA	HSA oldatban inkubált platínával bevont poliszilícium	a felszín egyenetlen, 100- 200 nm-es felszíni egyenetlenségek

2. táblázat: A kontakt szög mérések során használt felület típusok elnevezései, rétegstruktúrái, és topográfiai jellemzői

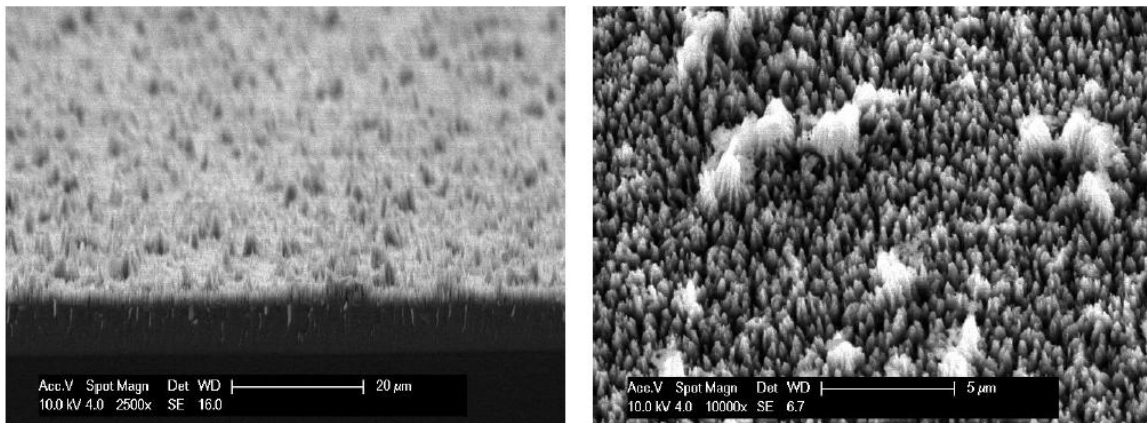
A rétegstruktúrában szereplő anyagok standard vastagsága	
Si	380 μm
SiO ₂	500 nm
Poly-Si alapréteg	1000 nm
TiOx tapadóréteg	15 nm
Pt vastagsága	30 vagy 100 nm a jelölésnek megfelelően
HSA	A 100μg/ml koncentrációjú HSA oldatból 2 óra alatt kitapadt HSA

3. táblázat: A rétegstruktúrában szereplő anyagok vastagsága

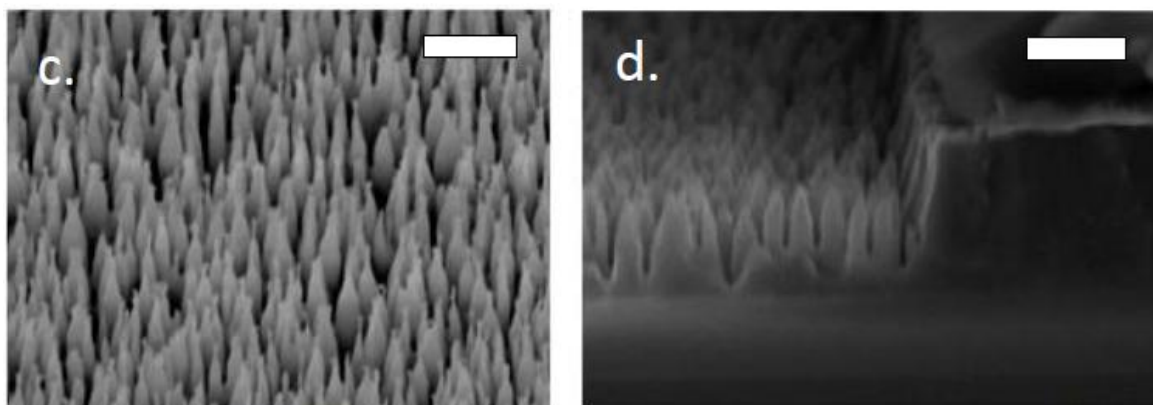
A felületi topográfia jellemzése

A különböző minták felületét SEM-mel és AFM-mel jellemztük.

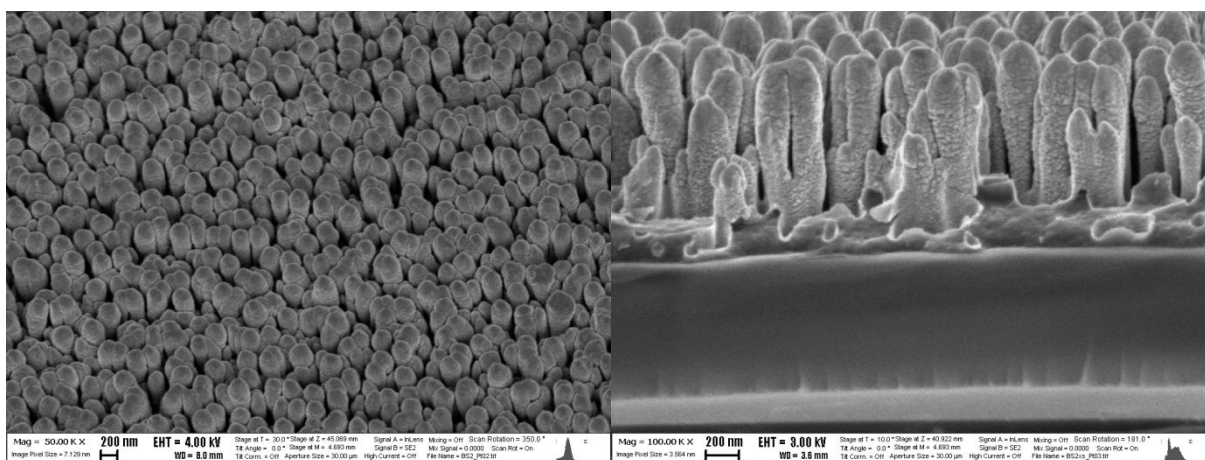
A 14 – 17. ábrákon a kapott képek láthatóak.



14. ábra: SEM képek az általunk vizsgált tömbi (egykristály) blackSi szelet felületéről. Az a) jelű ábrán oldalnézetből, a b) jelű ábrán pedig felülnézetből látható, hogy a kisebb méretű kúpok között nagyobb méretűek is találhatóak a felszínen.

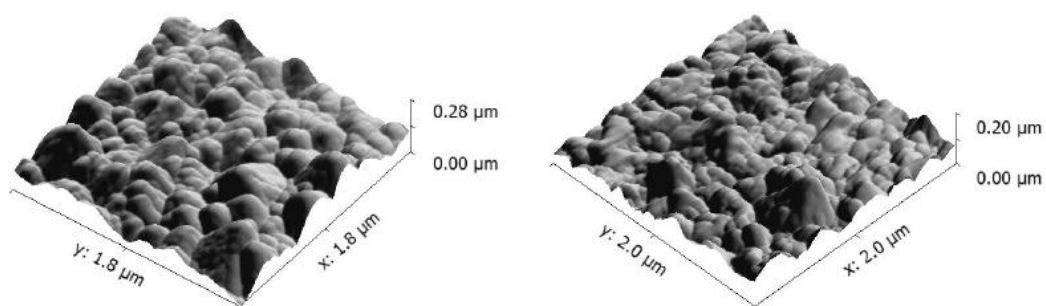


15. ábra: polisziíciumból készült nanostruktúra. Az ábrákon lévő fehér színű léptékvonal a valóságban 500 nm-nek felel meg [27].



16. ábra: Black Poly Si TiOx/100nm Pt-val. A platínával borított felszín esetében nem hegyes kúpokként jelennek meg a felületi struktúraelemek, hanem inkább oszlopokként.

A poly-Si felületét AFM-mel jellemeztük, mivel ezzel a technikával a felület igen kis egyenetlenségei is jól láthatóvá válnak.



17. ábra: A fenti platina AFM-es képe három dimenzióban [27]

Kontakt szög mérés

Természetes körülmények között levegőn a szilícium felületére oxidréteg rakódik, melynek hatására megváltozik a felület hidrofóbicitása. Az oxidrétegnek ezt a hatását már eddig is ismertük, mi azonban arra is kíváncsiak voltunk, hogy ez az oxidréteg milyen mértékben változtatja meg a felületet. Így ezt az oxidréteget eltávolítottuk az egyes felületekről (hidrogén-fluoridba, HF-be merítettük a mintákat 2-3 percre), majd ezt követően a lehetőségekhez képest azonnal megmértük a kontakt szöveget, hogy minél kevesebb oxigén adszorbeálódjon a felületen.

Minden felülettípus esetében 8 – 10 db különböző mérést végeztem, és ezek átlagával számoltam a továbbiakban. Egy – egy mérés esetén 1 µl-es desztillált vizet cseppentettem egy Hamilton pipettával függőlegesen közvetlen a felület fölé befogva. Még a cseppentés előtt élesítettem a kamera képét, így viszonylag gyorsan (mintegy 5-10 másodperc alatt) el tudtam menteni a képeket, így a csepp alak párolgásból eredő változásai elhanyagolhatóak voltak.

A laborban a hőmérséklet 21 – 22 °C között ingadozott, a mérőhelyen a páratartalom pedig 56 – 60% közötti értékek között volt. Ezt követően az egyes felülettípusokról AFM illetve SEM képeket is készítettünk, így láthatóvá téve az adott struktúrákat.

Egy másik kísérletsorozatban az egyes mintákat HSA fehérjével is kezeltem.

A kísérlet célja, hogy megállapítsuk, az egyes felületekre milyen mértékben tapad a modellfehérjénk, hiszen ez nagyban befolyásolja a későbbi sejttapadási értékeket is.

A mintákat többféleképpen kezeltük (rászárítottuk az oldatot; fehérjeoldatban áztattuk különböző ideig, majd leszívtuk a minta felületéről a felesleget; leszívtuk, és le is mostuk a felületet), majd fluoreszcens mikroszkóppal megnéztük a referenciamintához képest végbement változásokat.



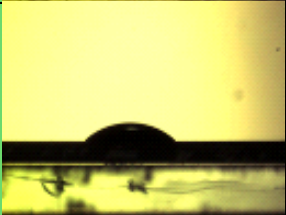
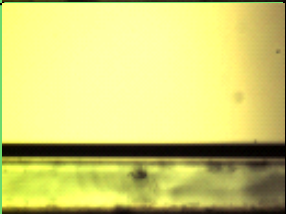
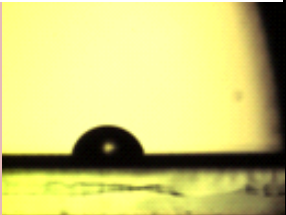

Ezeket a méréseket is a tisztatérben lévő speciálisan erre kialakított mérőállomáson végeztem. Nagy felbontású videót rögzítettem a cseppentés pillanatát követő 3 másodpercről, majd a videó első képkockáit használtam fel a szögek mérésekor. (A felvételeken a cseppentés, és a videófelvétel elindítása közti időszakok nem kerültek rögzítésre, így az ekkor bekövetkező változásokat, párolgást az elemzések során elhanyagoltam).

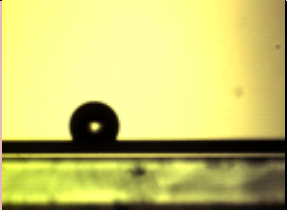
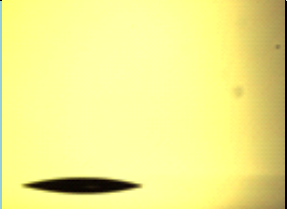
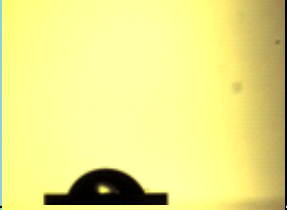

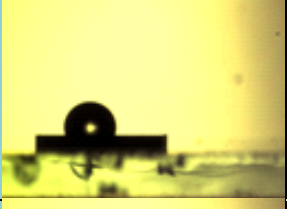
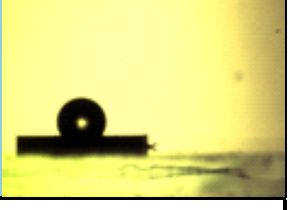
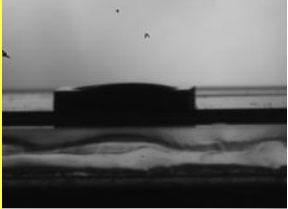

A HSA fehérje vizsgálatainál 0,3 µl-es desztillált vizes cseppekkel dolgoztam, melyeket automata pipettával mértem ki, és cseppentettem a minták felszínére. Azért volt szükség ilyen kis térfogatú cseppekre, mert az egyes mintatípusokból csak mintegy 3x3 mm-es területű lemezkék álltak rendelkezésre.

A méréseket két részletben végeztem, a referencia minták mérése során a hőmérséklet 21 °C-os volt, a kezdeti páratartalom pedig 56%. A HSA-val kezelt minták esetében az értékek 21,5°C és 75%-os kezdeti páratartalom. (Mivel a mintatér a mérések során nyitva van, a mérések közben a páratartalom 60% körüli értékeket vett fel, tehát a körülmények nem tértek el olyan mértékben egymástól, ami az eredményeket számottevően befolyásolná).

A szögek mérését a Fiji nevű program szögmérőjével végeztem [31].

A vizsgált minták kontakt szög értékei

Minta	Kontaktsszög átlag Szórás	Kép
Minták natív oxidréteggel		
Si	39,78° 1,46°	
PolySi	50,03° 0,34°	
SiO2	44,39° 0,77°	
bSi	0° 0°	
Minták HF-os kezelés után		
Si	65,15° 0,84°	
PolySi	54,89° 0,52°	

bSi	116,13° 0,89°	
Minták platinázott felszínnel		
Pt	17,67° 2,71°	
PolySi + 30nm Pt	75,57° 8,72°	
PolySi + 100nm Pt	75,03° 9,72°	
bSi + 30nm Pt	110,29° 2,53°	
bSi + 100nm Pt	110,15° 4,65°	
HSA fehérje mérések referenciamintái		
bpSi	11,11° 2,18°	
pbSi + Pt	112,53° 7,62°	

PolySi	14,82° 4,32°	
PolySi + Pt	75,33° 9,09°	
Minták HSA fehérjeméréshez		
pbSi + HSA	25,9° 9,09°	
pbSi + Pt + HSA	77,18° 12,2°	
PolySi + HSA	62,42° 3,5°	
PolySi + Pt + HSA	67,72° 4,66°	

4. táblázat: A vizsgált minták kontakt szög értékei. A különböző mérésorozatok különböző színű hátterekkel szerepelnek. A középső oszlopban a félkövérrel írt számok az átlagos kontakt szög értékeket jelölik, alattuk kisebb betűmérettel a hozzájuk tartozó szórások láthatóak. A kapott értékek 8 – 10 db mérés átlagos értékeit, és szórásait mutatják.

A kontakt szög változása felületi oxid- illetve platinaréteg hatására

Az alábbi táblázatban összefoglalva láthatóak az egyes mintatípusok átlagos kontakt szög értékei oxidréteg nélkül (frissen HF-ezett), natív oxidréteggel és platina vékonyréteggel a felületükön.

Minta	Frissen HF - ezett felület	Natív oxidos felület	Pt-val borított felület	Felületi érdesség
Si	65°	40°	18°	Atomi simaság
Poly-Si	55°	50°	75°	Max 200 nm-es R _{max} , gömbölyű szemcsék
bSi	116°	0°	110°	Max 15 µm-es R _{max} , hegyes
SiO ₂	-	44°	-	Közel atomi simaságú

5. táblázat: Kontakt szög változás a natív oxid jelenléte és Pt vékonyréteg hatására. (Jelölések: Si – atomi simaságú szilícium, Poly-Si – polyszilícium, bSi – fekete(black) szilícium, SiO₂ – szilícium – dioxid)

Az adatokból láthatjuk, hogy az oxidréteggel borított felületek mind hidrofílebbek (tehát kisebb szögeket kaptunk), mint a frissen tisztított minták. A fekete szilícium esetében a legnagyobb mértékű a változás, mert az egyébként erősen hidrofób Si felület a natív oxidréteg hatására szuperhidrofillé válik.

Érdekes megfigyelni a platínával borított mintákat is, ha nem atomi simaságú felületet vizsgálunk, akkor a felszíni platinaréteg hatására egyértelműen víztaszítóbbá válik a minta.

A sima felszínű minta látszólag ellentétes viselkedését pedig az irodalom igazolja: a Pt önmagában (atomai simaságú és tisztaságú esetben) szuperhidrofil felület lenne. [32]

Black Si nedvesítési modellje

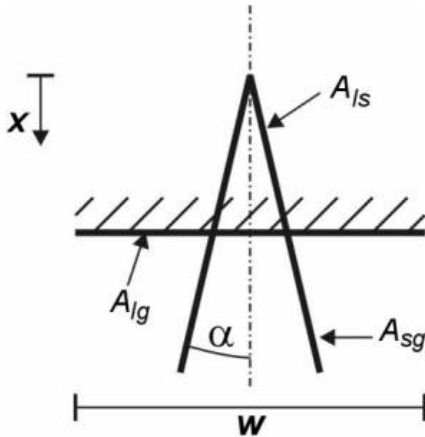
A laborunkban készített fekete szilícium (black Si) [27] nedvesítési tulajdonságainak jellemzésének céljából létrehoztam egy modellt C. Dorrer és munkatársainak [21] munkája alapján, mellyel az általunk készített felületek paramétereivel is viszonylag egyszerűen számolhatunk. A modell alapján a kritikus θ szöget lehet előre meghatározni, melyet összevetve a kapott mérési eredményekkel értékes információkhoz juthatunk a nedvesítési tulajdonságokat illetően. A számításokhoz a nanostrukturált felületet négyzetes alapú nanométeres nagyságrendű kúpokként írtam le.

Bár ez a modell nem adja vissza a strukturált felületek pontos mását, de valós közelítést adhat számos jellemző paraméter esetén. A számolás során a következő módszert alkalmaztam:

Az első kérdés, hogy mekkora felülettel érintkezik a folyadék a szilárd közeggel. Ezt elnevezzük ϕ -nek. Ennek meghatározásához a lenti ábrán látható elemi cellákkal szükséges számolni.

Amennyiben a folyadék meniszkusza érinti a kúpot, azon a helyen beszélhetünk θ szögről. Beláthatjuk, hogy a folyadék – szilárd határfelület nagysága attól függ, hogy a folyadék milyen mélyre hatol be a kúpok közé. Ezt a mélységet nevezzük el x -nek.

Mivel x időben változik, ahogy a kúp tetejétől az aljáig leér, az alábbi differenciálegyenletekkel számolhatunk:



$$dA_{ls}(x) = 2\pi \cdot \frac{\tan\alpha}{\cos\alpha} \cdot x \cdot dx$$

$$dA_{lg}(x) = -2\pi \cdot \tan^2\alpha \cdot x \cdot dx$$

$$dA_{sg}(x) = -dA_{ls}(x)$$

18. ábra: A modell elemi cellája oldalnézetből, mely nanométeres nagyságrendű kúpkból álló felülettel számol. Az α szög az oszlop szögét jelenti, a w pedig a cella szélességét. A_{ls} : folyadék – szilárd határfelület, A_{sg} : szilárd – gáz határfelület, A_{lg} : folyadék – gáz határfelület, x : a folyadék lehatolási mélysége [21]

Az előbbi egyenleteket megkapva meg tudjuk határozni a felületi energiának a kis megváltozását (dG_{IF}) is: (A folyadék – gáz határfelületi feszültséget víz – levegő esetén 70N/m-nek vesszük) [21]

$$dG_{IF}(x) = \gamma_{lg} \cdot dA_{lg}(x) - \gamma_{ls} \cdot \cos\theta \cdot dA_{ls}(x)$$

Végző soron tehát a fentiekből következik, hogy a csepp kúpok közé jutásának mértékét (x -et) a modell alapján a következő egyenletből tudjuk meghatározni:

$$\frac{dG_{IF}(x)}{dx} = \Delta P \cdot A_{lg}(x)$$

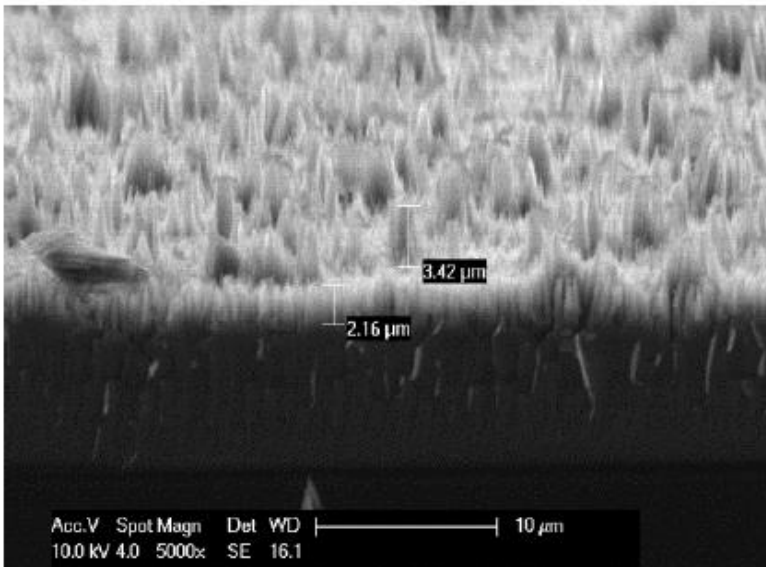
A fentiekből pedig már ki tudjuk számolni ϕ értékét a folyadék – szilárd, illetve a másik két felület aránya alapján. Ha így egy kis értéket kapunk (1-nél kisebbet), akkor az azt jelenti, hogy a folyadék kis felületen érintkezik a kúpok felszínével, tehát nem folyik be közéjük mélyre, így a Cassie – modellt lehet használni, amiből megkaphatjuk a nyugalmi θ szöget.

Wenzel nedvesítés esetén a fent tárgyalt képlettel megkaphatjuk az ilyen típusú rendszerekre jellemző szöget, illetve a kritikus kontakt szög értékét, ami elválasztja a Cassie – állapotot a Wenzel állapottól.

Így ennek a modellnek a segítségével megkaphatjuk, hogy a mi esetünkben milyen felületi tulajdonságokkal rendelkeznek a vizsgált fekete szilícium szeletek, ehhez pedig nincs másra szükség, mint kontakt szög mérésre, illetve a felület paramétereinek ismeretére.

Az általunk vizsgált fekete szilícium szeletekről pásztázó elektronmikroszkópos képeket készítettünk, így látjuk a felület topológiáját, és ez alapján állítottam fel a modellt, és ezzel számoltam tovább.

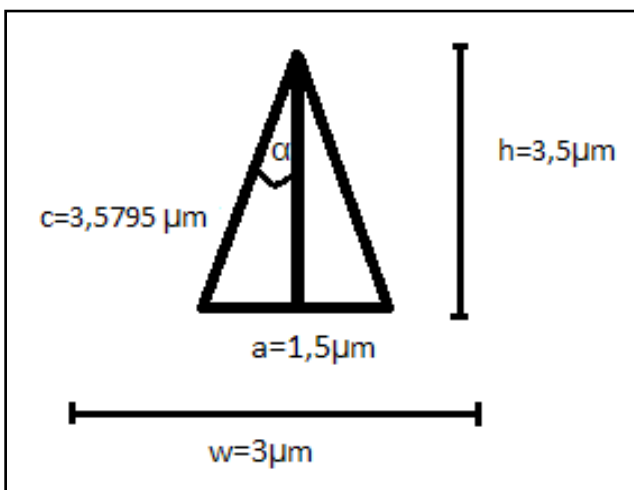
A felvételen látható, hogy a struktúra összetett, ha a fenti modell szerinti kúpokként kezeljük



a felületi elemeket, akkor két féle kúpot feltételezhetünk, egy kisebb típusút, illetve egy nagyobb típusút. Vizsgálataink során kiszámoltuk külön mindkét típusra az értékeket, végül ezeket együttesen vizsgáltuk, és reményeink szerint így kaptuk meg a valóságot leginkább megközelítő, és egyben legjobban modellezhető értékeket.

19. ábra: SEM felvétel az egyik vizsgált bSi szeletről

Modell nagyobb kúpok esetén:



Adatok:

$$\gamma_{lg} = 70 \text{ mN/m} = 70 \cdot 10^{-3} \text{ N/m} = 0,07 \text{ N/m}$$

$$R_{HFbSi} = 0,634 \text{ mm} = 0,634 \cdot 10^{-3} \text{ m}$$

$$\tan \alpha = \frac{0,75 \mu\text{m}}{3,5 \mu\text{m}} = 0,2142 \rightarrow \alpha = 12,09^\circ$$

$$w = 3 \mu\text{m} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ m}$$

$$\Theta_{HFbSi} = 116,13^\circ$$

$$\Theta_{HFSi} = 65,15^\circ$$

Kapott eredmények:

$$x = |-9,79097 \cdot 10^{-8}| \text{ m}$$

$$\varphi = \frac{A_{ls}}{A_{ls} + A_{lg}} = 0,000732907$$

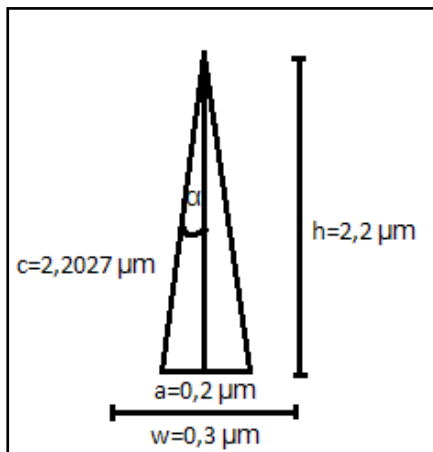
$$\Theta_c = 177,386^\circ$$

$$r = 1,9371$$

$$\Theta_w = 43,0075^\circ$$

$$\theta_{w-c} = 125,05^\circ$$

Modell kisebb kúpok esetén:



Adatok:

$$\gamma_{lg} = 70 \text{ mN/m} = 70 \cdot 10^{-3} \text{ N/m} = 0,07 \text{ N/m}$$

$$R_{\text{HFbSi}} = 0,634 \text{ mm} = 0,634 \cdot 10^{-3} \text{ m}$$

$$\tan \alpha = \frac{100 \text{ nm}}{2200 \text{ nm}} = 0,0455 \rightarrow \alpha = 2,6023^\circ$$

$$w = 300 \text{ nm} = 300 \cdot 10^{-9} \text{ m}$$

$$\Theta_{\text{HFsi}} = 65,15^\circ$$

Kapott eredmények:

$$x = -2.392259143710033 \times 10^{-8} \text{ nm}$$

$$\varphi = \frac{A_{ls}}{A_{ls} + A_{lg}} = 0.000090795$$

$$\theta_c = 179.077^\circ$$

$$r = 833 \text{ um}^2 / 100 \text{ um}^2 = 8.33$$

$$\cos \theta_w = r \cdot \cos \theta \rightarrow \theta_w = 0 + 110.2i \text{ (0 valós rész)}$$

$$\cos \theta_{w-c} = \frac{\varphi - 1}{r - \varphi} \rightarrow \theta_{w-c} = 96.89^\circ$$

Modell a két féle kúp együttes előfordulása esetén:

Mivel a fentiek során csak az egyik féle kúp előfordulásával számoltunk, a maradék területen a felszínt vízszintesnek tételeztük fel, ez a megközelítés megkönnyíti a számolást, viszont kevésbé fedti a valóságot. Ezért, ha a két modell szuperpozícióját vesszük, jobban közelíthetjük vele a valóságot:

- felszín nagy kúpok esetén: $133,3343 \mu\text{m}^2$
- felszín kis kúpok esetén: $833 \mu\text{m}^2$
- $r=6,24$

A ϕ értékek arányából arra lehet következtetni, hogy a határfelületek aránya a nagy kúpok esetében a teljes határfelület 12%-át teszik ki, a kis kúpok pedig a 88%-ot. Ennek alapján arra következtetnek, hogy a valós kritikus határszög a két modell esetében mért érték között helyezkedik el, a ϕ értékek arányában.

Jelen esetben ez az érték hozzávetőlegesen:

$$\theta_{w-c} = 102^\circ$$

Modell a felületi oxidréteg figyelembe vételével

A fenti számolások során a felületi oxidréteget figyelmen kívül hagytam, annak érdekében, hogy tovább finomítsam a modellt, a fenti számolást úgy is végigvezettem, hogy a natív oxidréteggel fedett 40° -os szöget vettem alapul, és így a következőket kaptam:

- oxidréteggel fedett modell kis kúpokkal kritikus kontakt szög értéke: $96,887^\circ$
- oxidréteggel fedett modell nagy kúpokkal kritikus kontakt szög értéke: $90,7632^\circ$

A kapott eredmények értékelése

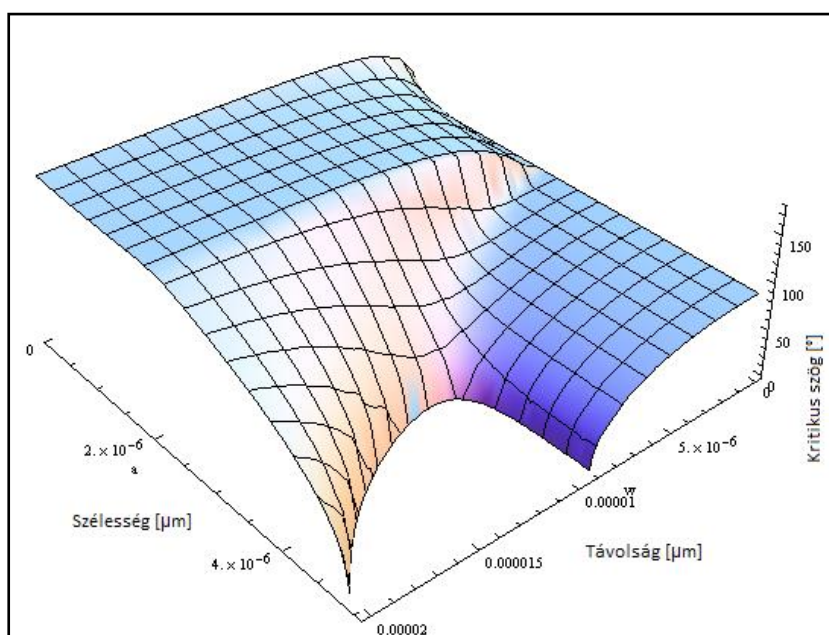
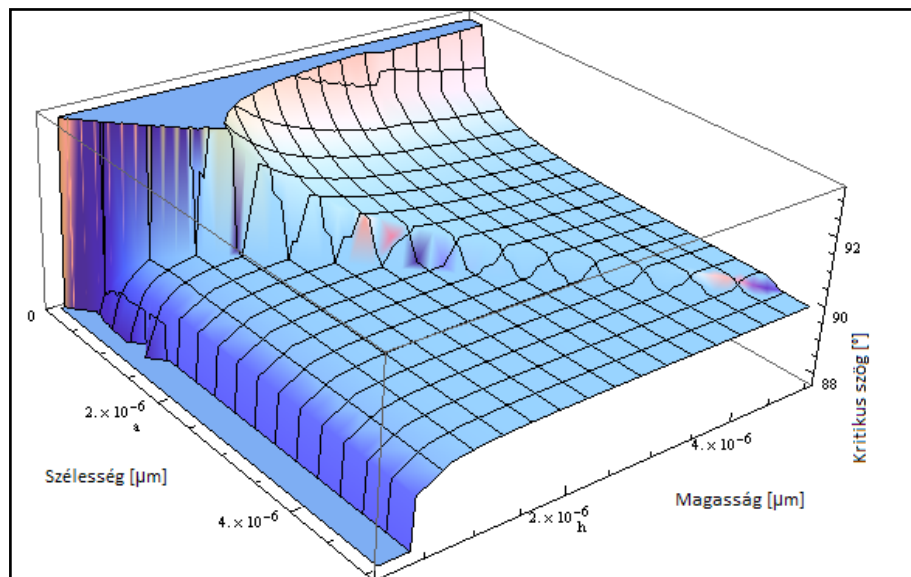
Az elvégzett vizsgálatok alapján az alábbiak állapíthatók meg a felületi tulajdonságokról:

- Látható, hogy az anyagi minőség jelentős mértékben befolyásolja a felület nedvesíthetőségét. Ez jól látszik például, ha megfigyeljük a platina, illetve a szilícium szeletekről készült képeket. (Az előbbi átlaga nem éri el a 18° fokot, míg a szilícium még oxidréteggel is több, mint 39° -os).
- Ezen felül a felületi struktúra is meghatározó tényező:
- Szilícium esetében:
 - o HFPolySi ($54,89^\circ$) \rightarrow HFSi ($65,15^\circ$) \rightarrow HFbSi ($116,13^\circ$)
- Platina esetében:
 - o Pt ($17,67^\circ$) \rightarrow PolySi_Pt ($\sim 75^\circ$) \rightarrow bSi_Pt ($\sim 110^\circ$)
- A kritikushatárszöget a felület struktúrája határozza meg leginkább. Esetünkben a felületi érdesség és az ehhez kapcsolódó felületmodell paraméterei befolyásolják a kritikus határszöget. (α, w, r)
- A felállított modell segítségével megállapítható, hogy a kritikus kontakt szög értéke **102°**
- E felett Cassie-állapot áll fenn, alatta pedig Wenzel nedvesítés jellemzi a felületet.

- A mi méréseink átlagosan $116,13^\circ$ -osak voltak, ami azt jelenti, hogy Cassie-állapotban vannak a cseppek.
- Mindezeken túlmenően a modellek alapján azt is észrevehetjük, hogy a felületi struktúraelemek tulajdonságai miként befolyásolhatják a felületet.
- Az első esetben, amikor csak a nagyobb kúpokkal számoltunk, a kritikus kontakt szög értéke $125,05^\circ$ volt, a kisebb kúpok esetében viszont $96,89^\circ$. Ha az ezekhez tartozó képleteket megnézzük, láthatjuk, hogy az α szögtől nagyban függ az eredmény. Itt a nagyobb α szög esetében nagyobb lett a kritikus kontakt szög is.

Az egyenletek kiszámításához a Wolfram Mathematica programot használtam, és a program segítségével paraméteresen is megoldottam. Az eredményeket pedig háromdimenziós függvények segítségével tettem szemléletesebbé:

20. ábra: A kritikus kontakt szög a kúpok szélességének és magasságának függvényében. Az ábrázolt intervallum a $0,1 - 5$ mikrométeres tartományokban lévő értékeket mutatja, így az általunk vizsgált topológia is a tartományba esik.



21. ábra: A kritikus kontakt szög a kúpok szélességének és a kúpok közti távolságának függvényében. A kúpok szélessége itt is $0,1 - 5$ mikrométer közti értékeket vesz fel, a távolság ábrázolása azonban egészen 20 mikrométerig terjed, így jól látszik, hogy nagyobb távolság esetén a kritikus kontakt szögek közötti átmenet nem annyira éles.

Kontakt szög változások HSA fehérjeréteg hatására

	Kontakt szög	Kontakt szög
Kiindulási minta	Referencia felület	HSA adszorpció után
PolySi	15°	62°
bpSi	11°	26°
PolySi + Pt	75°	68°
pbSi + Pt	113°	77°

6. táblázat: Az alábbi táblázat a HSA oldatos inkubálás előtti és az azt követő átlagos kontakt szög értékeket mutatja:

Az eredményeket 2 órás 100 µg/mL-es HSA oldatban való inkubálást követően kaptam. A mintákat az inkubálási idő után az oldatból kivettük, desztillált vízzel leöblítettük, és legalább egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten megszártottuk.

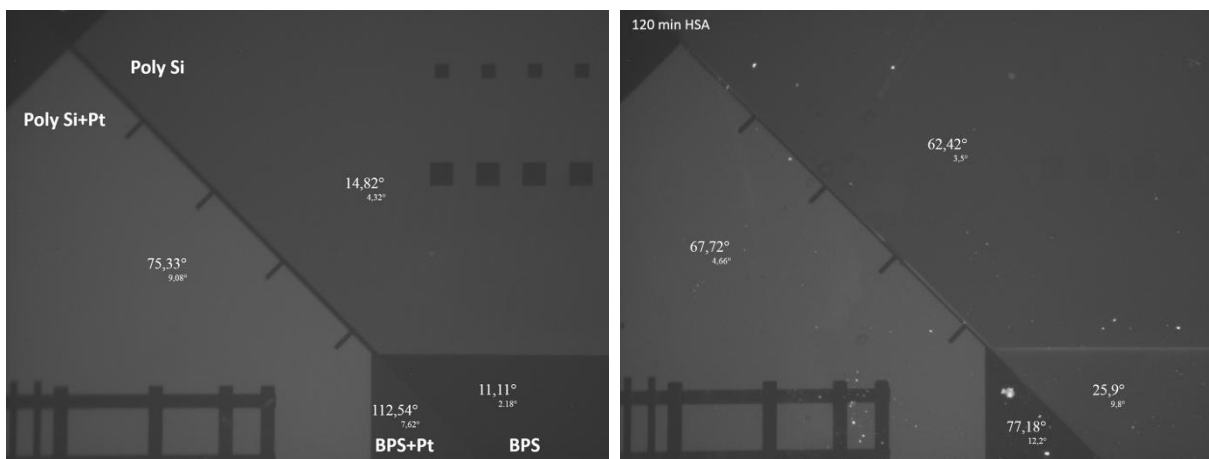
Az oldat koncentrációja a fiziológiás koncentrációk alatt van, adszorpciós vizsgálatokhoz ebben a tartományban szoktak mérni, mivel itt a legmeredekebbek a fehérje – felületi adszorpciós izotermák [33]. A mi esetünkben jobb lenne egy nagyobb koncentráció, mivel így kis körülményváltozás hatására sem lenne nagy adszorpció változás a felületen.

A kapott eredményeket összehasonlítottam az eddigi irodalmi adatokkal. A HSA fehérje mellett gyakran alkalmazzák kísérletekhez a BSA fehérjét is (borjú szérumalbumin), mely 76%-os homológiát mutat a humán albuminnal [33]. Így a BSA-val végzett vizsgálatok is releváns adatokkal szolgálhatnak. Az én eredményeimből is látszik, hogy az egyébként hidrofil felülethez, ha egy amfifil fehérjét adszorbeáltatunk, akkor az növelni fogja a hidrofobicitást. Ha viszont hidrofób felülethez tapad a fehérje, akkor hidrofilebbé fog válni [33].

A kapott értékek alapján azt látjuk, hogy a HSA fehérje valamilyen mértékben minden felülettípus felületi tulajdonságait módosította. Ha figyelmesebben megnézzük az eredményeket, láthatjuk, hogy az alacsony kontakt szög értékek nagyobbak lettek (pl. pbSi esetén a mintegy 11° átlagérték majdnem 26°-ra növekedett), míg a nagyobb értékek alacsonyabbak lettek a kezelést követően (pl. a pbSi+Pt 112 fokos átlagértéke hozzávetőleg 77 fokra módosult). Feltételezésünk szerint ezek az értékek a HSA fehérje saját kontakt szög értékeivel módosított értékek, mely annak a függvénye, hogy a felületen mennyi fehérje rakódott le. Mivel az egyes értékek nem azonos mértékben módosultak, arra következtethetünk, hogy a fehérje nem minden felszínre tapadt egyforma mennyiségben. Pontosabb kvantitatív eredményeket ez alapján azonban nem lehet megállapítani.

A fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok eredményei

A vizsgált mintákat fluoreszcens mikroszkóppal is megvizsgáltam (felvételt készítettem a fehérjebevonat előtti és utáni felszínről azonos beállítások mellett, és a fényintenzitás különbségeinek szemléltetésére kivontam egymásból a képeket.



22. ábra: A HSA fehérjével kezeletlen (bal oldali ábra), és a fehérjeoldattal kezelt (jobb oldali ábra) mintáról készült mikroszkópos felvételek. Az egyes területeken lévő számok az adott anyagi minőséghez tartozó átlagos kontakt szög értékeket mutatják, alattuk kisbetűvel pedig a hozzájuk tartozó szórások láthatóak.

Fényintenzitás különbséget egyedül a fekete szilícium esetében tapasztaltam a kivont képen, a többi felület esetében nem volt látható különbség. Ezzel látszólag ellentmond, hogy a polyszilícium felület kontakt szög változása jóval nagyobb volt, ott vártuk volna a legintenzívebb jelet. Ennek azonban több magyarázata is lehet.

A szakirodalom szerint a szilícium abszorpciós maximuma 480 nm körüli hullámhossznál tapasztalható, ami elnyelheti a fluoreszcen által emittált fény egy részét [33]. Másrészt, mivel a nanostrukturált felület a felszíni struktúrák miatt megnövekedett felszínnel rendelkezik a sima felületekhez képest, kézenfekvő az a magyarázat, hogy a megnövekedett felszínre arányosan több fehérje rakódik le, ami a mikroszkópban is láthatóvá válhat. Irodalmi adatok alapján a fehérje kitapadás preferált helyei az élek és hegyek, így az élek mentén ill. a fekete Si hegyein is jogosan várhatjuk a HSA jelenlétét.

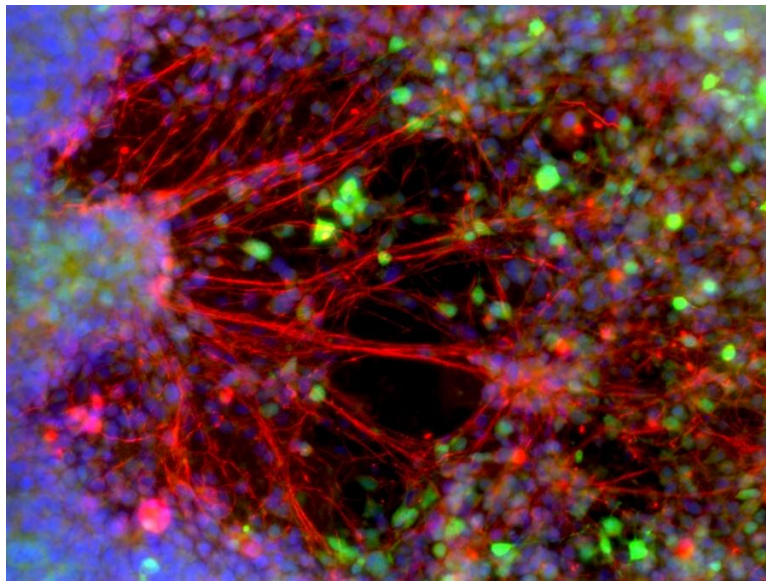
Másrészt, ahogy a felületi elemek közé kitapadtak a fehérjék, a folyamat maga módosíthatja a felület geometriai viszonyait, melynek hatására megváltoztak az optikai tulajdonságok is, csökkenhetett a fekete Si elnyelő képessége/feketesége.

A platínával bevont felületekről sem egyszerű megállapításokat tenni, mivel ez esetben is többféle hatást egyidejűleg kell figyelembe venni. A delokalizált elektronfelhő végett negatívan töltött Pt felület taszítja a negatívan töltött albumin molekulát, így arra számítottunk, hogy a Pt felületre fog a legkevesebb HSA kötődni. Az *in vitro* vizsgálatok sejttapadási eredményei ezt az elképzelést támasztják alá. Egyes irodalmi adatok alapján azonban a nanostrukturált Pt felületekre több albumin kötődik, mint a sima Pt felületre [33]. Mivel az albumin molekula alapvetően hidrofób tulajdonságú, így a hidrofób felületeket részesíti előnyben. Ez alapján azt várhatnánk, hogy a Pt-val bevont felületekre fog kitapadni.

Mivel a különböző folyamatok különböző mértékben erősítik (élek, hegyek, nanostrukturált felület, hidrofobicitás) és gyengítik (sima felszín, hidrofil felszín, fémes felszín) az albumin tapadását, így a kontakt szöges és fluoreszcens mérések alapján csak azt mondhatjuk el, hogy nagy valószínűséggel az összes felületre tapadt ki HSA. A kvantitatív analízishez azonban ezek a mérések nem alkalmasak, ehhez abszorbancia méréseket tervezünk a jövőben végezni.

***In vitro* vizsgálatok eredményei**

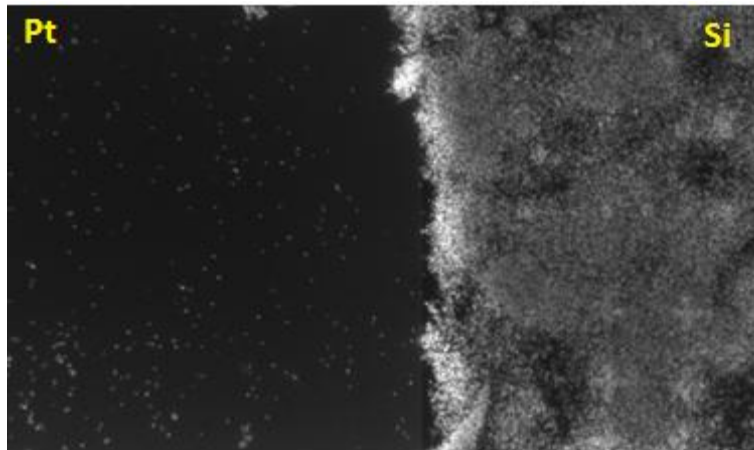
Az *in vitro* vizsgálatok során az MTA KOKI kutatócsoportjával közösen megfigyeltük az idegi progenitor sejtek, a már differenciálódott idegi sejtípusok és az egyes elektródafelületek közötti kölcsönhatásokat.



23. ábra: Az indukciós vizsgálatok során készített felvétel fekete szilícium szeleten differenciálódott neuronokról. A képen a piros szín a neuronális nyúlványokat mutatja. Kékkel a sejtmagk, zöld színnel pedig a citoplazmák láthatóak.

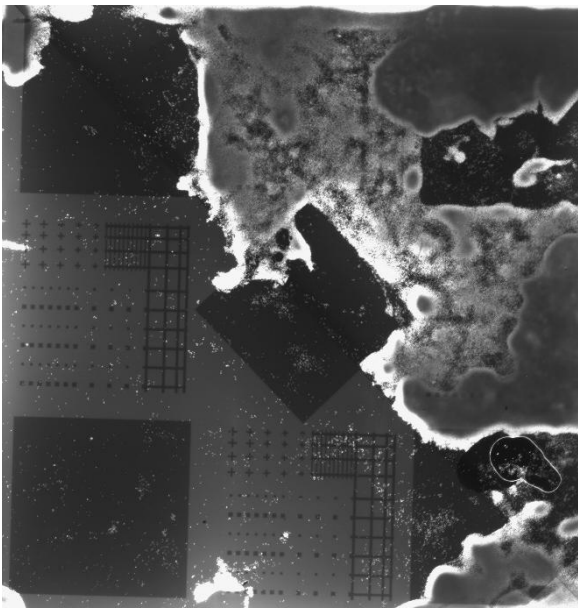
A kísérletek kivitelezésében és az eredmények kiértékelésében én is segédkeztem, és a következőket állapíthattuk meg:

- A még differenciálatlan sejtek esetében a kitapadásbeli különbségek nem voltak statisztikailag kimutathatóak. Ennek ellenére a már indukált sejtek vizsgálatakor az összes mintán jelentős különbségeket láthatunk már pusztán szemmel is. Mindegyik felületen egyértelműen elkülöníthetők a platinával bevont a régiók a platina nélküliektől. Bár a platinázott felszíneken is jelen voltak a sejtek, de a tapadásuk sokkal gyengébb volt rajtuk, néhány mosás hatására könnyen leszakadtak a mintáról.

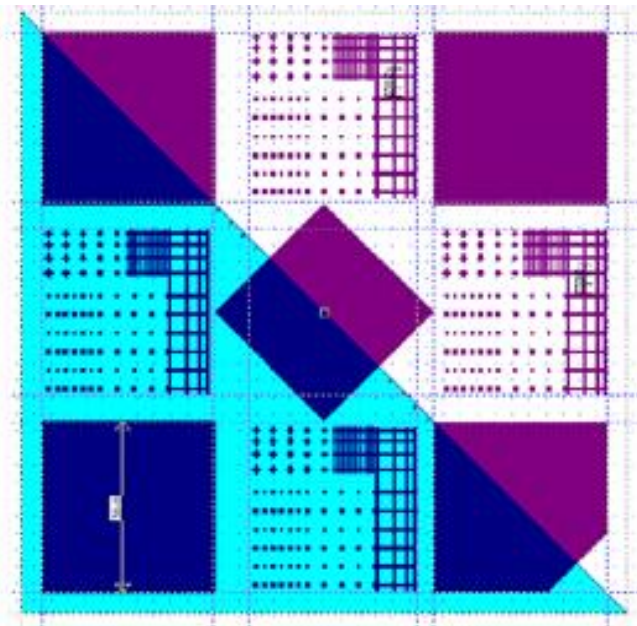


24. ábra: A képen jól látszik, hogy a minta platinázott felszínű bal oldalán alig vannak sejtek. A jobb oldali Si felszínen sűrű sejtszőnyeg látható. A kép a sejtek sejtmagjait mutatja, melyek a még differenciálatlan őssejtek, átmeneti alakok, és neuronok, gliák egyaránt lehetnek. (A kép ötszörös nagyítással készült Dapi szűrővel)

- Az MTA KOKI laborjában lévő mikroszkóppal is készítettünk néhány képet, mert az ott készült felvételek élesebbek. A készült képeket ezután a Fiji program MosaicJ képösszeűző funkciójával – melyet P- Thévenaz és munkatársai is javasolnak [34] - összeillesztettük, így a teljes mintafelület egyszerre jól látható.



25. ábra: Az indukált sejtekről készült felvételek összefűzött képe. Jól látszik, hogy a sejtek a platina borítás nélküli oldalt preferálják, a „sejtszőnyeg” több helyen szabályosan kirajzolja a platinázott felszín határait.



26. ábra: az összehasonlíthatóság miatt itt látható a minta elrendeződése is az egyes felületekkel. . A halványkék szín a platinázott felületeket jelöli, lilával a fekete szilícium részeket láthatjuk (platina nélkül), a sötétkék területek pedig a platinnal borított fekete szilícium területek.

A halványkék szín a platinázott felületeket jelöli, lilával a fekete szilícium részeket láthatjuk (platina nélkül), a sötétkék területek pedig a platinnal borított fekete szilícium területek.

Konklúzió

Dolgozatom készítése során az idegszövetbe ültethető implantátumok biokompatibilitását kívántam növelni a potenciális implantátumfelületek tulajdonságainak vizsgálata által.

Munkám első felében a nanostrukturált felszínű, úgynevezett fekete szilícium felületi tulajdonságait vizsgáltam meg. A felület geometriája alapján modellt állítottam fel arra vonatkozóan, hogy milyen a felület nedvesíthetősége. Egy szervezetbe szánt eszköz készítése során elengedhetetlen tudni, hogy a felszín milyen kapcsolatban áll a környezetével. Ez pedig a kémia mellett a felületi topológiától is függ. A modell alapján megállapíthattam, hogy a mért kontaktszögek átlaga a kritikus kontaktszög alatti érték, tehát az oxidmentes fekete szilícium mintánk Cassie nedvesítési állapotban van, a felületi elemek közé nem jut be bejut a vízcsepp. Natív oxidréteggel viszont szuperhidrofil felületet képez, Wenzel állapotban van,, így a tervezett szenzor teljes felületével képes lesz érintkezni a szöveti nedvekkel.

Ezen kívül humán szérum albumin fehérjével (HSA-val) demonstráltam, hogy a tapadás egyetlen fehérje esetén is erősen függ a felület töltöttségétől, topográfiájától, hidrofil/fób mivoltától, a fehérje töltöttségétől (ami a pH-tól is nagyon függ) jellemző kötőhelyeitől. A HSA fehérje fiziológiás pH-n negatív töltésű, és 11 kötőhelyet tartalmaz hidrofób felületek számára [33].

Az általam vizsgált felületekre a kontakt szög változás alapján láthattam, hogy mindegyikre tapadt valamilyen mértékben a fehérje. A fluoreszcenciás vizsgálatok alapján pedig megállapíthattam, hogy az élek, hegyes nanostruktúrák preferáltak lehetnek.

A fehérje tapadás is igen lényeges az eszköz fejlesztése során, mert *in vivo* ill. *in vitro* közegben a sejtek nem közvetlenül a felületre tapadnak, hanem a felületre tapadt fehérjékhez. Ha olyan molekulát választunk, amit specifikusan csak egy sejtípus köt, praktikusán a neuronokat, akkor sikerül a gliális hegeképződést csökkenteni, ami hosszabb távú és érzékenyebb jeldetektálást tesz lehetővé.

Az *in vitro* vizsgálatok eredményein is látszik, hogy a felületi fehérjén, illetve a felületi topológián túl az adott anyag anyagi minősége is rendkívüli mértékben befolyásolja a felületi tulajdonságokat. A kapott képeken jól látszik, hogy a platinázott felszínt a már differenciálódott sejtek sokkal kevésbé tolerálják, mint a szilícium felszíneket felületi érdességtől függetlenül.

Ez a jövőre vonatkozóan azt jelentheti, hogy egy elektróda tervezésénél érdemes lehet a platinázott felszíneket minimalizálni, mert *in vitro* környezetben a neuronok ezt az anyagot "nem kedvelik".

Összességében tehát elmondható, hogy eszköztervezéskor mindegyik tulajdonságot egyforma mértékben, és egyidejűleg kell figyelembe venni, ami igen komplexé teszi a folyamatot.

További tervek

Amennyiben képesek leszünk olyan felületeket kialakítani, melyek szelektíven hatnak az egyes idegsejt típusokra, úgy a jövő eszközeivel tudatosan befolyásolhatjuk a sejtek viselkedését, melynek számos előnye lehet mind a neurobiológiai alap kutatásokban, mind pedig a klinikumban.

Ennek érdekében a továbbiakban szeretnék még több fehérjét vizsgálni, melyek megfelelőek lehetnek. A sejtek adszorpciójában részt vevő N-CAM adhéziós molekulák is kiválóak lehetnek erre a célra, így a jövőben ezekkel is dolgozni szeretnék.

Ezeken túlmenően a kontakt szöges mérések mellett figyelmet szeretnék fordítani a kvantitatív vizsgálatokra is.

Ezekhez jó módszer lehet az ellipszometria, melynek segítségével nanométeres nagyságrendben lehet detektálni a minta rétegeit, így a felszínre tapadt molekulákat is meg lehetne mérni [35]. A módszer nagy előnye, hogy viszonylag gyorsan, egyszerűen, roncsolásmentesen lehet vizsgálni a kívánt mintákat.

A jövőben pedig az ígéretesnek tűnő anyagokat szeretnék *in vivo* is tesztelni először csak a biokompatibilitás szempontjából, hogy végül a teljes eszközt elkészíthessük, mely amellet, hogy jóval érzékenyebb a jelenleg kapható eszközöknél, tovább bent is maradhat az idegszövetben, így lehetőség nyílik igazán hosszú távú *in vivo* vizsgálatokra, illetve klinikai alkalmazásokra is.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm konzulenseimnek Pongrácz Anitának és Ender Ferencnek, hogy a dolgozat megírása során segítettek munkámat.

Hálás vagyok a segítségért és az útmutatásért Sztyéhlikné Bérces Zsófiának, és Fekete Zoltánnak, illetve a Mikrotechnológia Labor dolgozóinak, kérdéseimmel bártan fordulhattam hozzájuk!

Továbbá köszönöm Madarász Emília és Pomothy Judit munkáját, akik az MTA KOKI laborjában tervezték és végezték az *in vitro* kísérleteket.

Valamint köszönöm a családomnak és barátaimnak a támogatást.

Irodalomjegyzék

- [1] L. Mertz: *What is biocompatibility?* IEEE Pulse (2013 July/August) 14-15
- [2] Michael V. Sofroniew: *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*, Trends in Neurosciences Vol.32 No.12 638 - 647 2009
- [3] Greger Hammarin, Henrik Persson, Aleksandra P. Dabkowska, Christelle N. Prinz: *Enhanced laminin adsorption on nanowires compared to flat surfaces*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 122 (2014) 85–89
- [4] Jennifer B. Recknor, Donald S. Sakaguchi, Surya K. Mallapragada: *Directed growth and selective differentiation of neural progenitor cells on micropatterned polymer substrates*, Biomaterials 27 (2006) 4098–4108
- [5] Gaëlle Piret, Maria-Therese Perez, Christelle N. Prinz: *Support of Neuronal Growth Over Glial Growth and Guidance of Optic Nerve Axons by Vertical Nanowire Arrays*, Applied Materials & Interfaces 2015/7 18944–18948
- [6] Megan S. Lord, Morten Foss, Flemming Besenbacher: *Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response*, Nano Today (2010) 5, 66–78
- [7] Zboray Géza: *Az idegrendszer*, Eötvös Kiadó, 1996
- [8] <http://www.qthera.com/live/getattachment/Technology/Overview/q-thera-simplified-neuron-and-glia.png.aspx> letöltés ideje: 2015.10.09
- [9] K. Markó, M. Ligeti, G. Mező, N. Mihala, E. Kutnyánszky, É. Kiss, F. Hudecz, E. Madarász: *A Novel Synthetic Peptide Polymer with Cyclic RGD Motifs Supports Serum-Free Attachment of Anchore-Dependent Cells*, Bioconjugate Chem. 2008, 19 1757 – 1766
- [10] Joshua Z. Gasiorowski, Christopher J. Murphy, and Paul F. Nealey: *Biophysical Cues and Cell Behavior: The Big Impact of Little Things* Annual Review of Biomedical Engineering, Volume 15, 2013
- [11] Ugo Cavallaro & Elisabetta Dejana: *Adhesion molecule signalling: not always a sticky business*, Nature Reviews Molecular Cell Biology 12, 189-197 (March 2011)
- [12] http://semmelweis.hu/biokemia/files/2014/01/HU_kon_SEJTADHEZIO_20110118.pdf letöltés ideje: 2015.10.18.
- [13] <http://www.uniprot.org/uniprot/P02768> a honlap megtekintésének ideje: 2105.10.06
- [14] James W. Hawkins, Achilles Dugaiczky: *The human serum albumin gene: structure of a unique locus*, Gene Volume 19, Issue 1, July–August 1982, 55-58

- [15] <http://www.edmundoptics.com/optics/optical-filters/bandpass-filters/fluorescence-filter-kits/67004/> honlap megtekintése: 2015.10.26.
- [16] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/P8920?lang=hu®ion=HU> a honlap megtekintésének ideje: 2015.10.06
- [17] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1AO6&bionumber=1&opt=3&jmolMode=JAV> letöltés ideje: 2015.10.06
- [18] Paul Roach, Neil J. Shirtcliffe, David Farrar, Carole C. Perry: *Quantification of Surface-Bound Proteins by Fluorometric Assay: Comparison with Quartz Crystal Microbalance and Amido Black Assay*, J. Phys. Chem. B 110, 20572-20579, (2006)
- [19] Y. Koc, A.J. de Mello, G. McHale, M.I. Newton, P. Roach, N.J. Shirtcliffe: *Nano-scale Superhydrophobicity: Suppression of Protein Adsorption and Promotion of Flow-Induced Detachment*, Lab Chip 8 (4), 582-586, (2008)
- [20] Yuehua Yuan, T. Randall Lee: *Contact Angle and Wetting Properties, Chapter 1*, Surface Science Techniques, Springer Series in Surface Sciences 51, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2013), 3-34
- [21] Christian Dorrer, Jürgen Rühle: *Wetting of Silicon Nanograss: From superhydrophilic to Superhydrophobic Surfaces*, Advanced Materials, 20, 159 – 163 (2008)
- [22] Y. Si, Z. Guo: *Superhydrophobic Nanocoatings: From Materials to Fabrications and to Applications*, Nanoscale, DOI: 10.1039/C4NR07554D, (2015)
- [23] D. Quéré: *Non-sticking drops*, Reports on Progress in Physics, vol. 68, pp. 2495 – 2532, Nov. (2005)
- [24] <http://webstore.diaginc.com/v/vspfiles/photos/WSN-AxioVert.A1-NI55-2.jpg> letöltés ideje: 2015.10.20.
- [25] Jeff W Lichtman, José-Angel Conchello: *Fluorescence microscopy*, Nature methods 2005 Dec; Vol 2. no.12 910 – 919
- [26] Damjanovich Sándor, Fidy Judit, Szöllősi János: *Orvosi biofizika*, Medicina kiadó, Második kiadás, Budapest, 600 – 602. o. és 574 – 576. o. (2006)
- [27] Z. Fekete, Á. Cs. Horváth, Zs. Bérces, A. Pongrácz: *Black poly-silicon: A nanostructured seed layer for sensor applications*, Sensors and Actuators (2014), 277-286. o.
- [28] Schlett K; Madarász E.: *Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency*, J Neurosci Res (1997) 47:405-415
- [29] Schlett K, Czirók A, Tárnok K, Vicsek T, Madarász E.: *Dynamics of cell aggregation during in vitro neurogenesis by immortalized neuroectodermal progenitors*, J Neurosci Res. (2000) Apr 15;60(2):184-94.

[30] K. Yamabe, K. Ohsawa, Y. Hayashi, R. Hasunuma: *Degradation of Atomic Surface Flatness of SiO₂ Thermally Grown on a Si Terrace*, Journal of The Electrochemical Society, 156 (12) G201-G205 2009

[31] <http://fiji.sc/Fiji> honlap megtekintése: 2015.10.26.

[32] K. W. Bewig, W. A. Zisman: *The Wetting of Gold and Platinum by Water*, The Journal of Physical Chemistry, 1965

[33] Susan C. Follstaedt, Julie A. Last, Dora K. Cheung, Paul L. Gourley, and Darryl Y. Sasaki: *Protein Adhesion on SAM Coated Semiconductor Wafers: Hydrophobic versus Hydrophilic Surfaces*, SAND 2000-3016, December 2000

[34] P. Thévenaz, M. Unser: *User-Friendly Semiautomated Assembly of Accurate Image Mosaics in Microscopy*, Microscopy Research and Technique, vol. 70, no. 2, pp. 135-146, February 2007.

[35] Lohner Tivadar, Gergely György, Petrik Péter, Fried Miklós: *Az ellipszometria alkalmazása félvezető-fizikai kutatásokban*, FIZIKAI SZEMLE 2007 / 9–10, 310 – 313