INTEGRÁLT OPTIKAI HULLÁMVEZETŐ SZENZOR ALKALMAZÁSA A BIOANYAGKUTATÁSBAN

Doktori értekezés

VÖRÖS JÁNOS

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológiai Fizika Tanszék

Témavezető:

Dr. Papp Elemér

1999

Tartalomjegyzék

BEVEZETÉS **4**

1 INTEGRÁLT OPTIKAI HULLÁMVEZETŐ SZENZOROK **7**

1.1 ELMÉLETI HÁTTÉR 7
1.1.1 Elektromágneses hullám terjedése hullámvezetőben 7
1.1.2 Hullámvezető módusok 9
1.2 AZ INTEGRÁLT OPTIKAI HULLÁMVEZETŐK KÉSZÍTÉSE 10
1.2.1 Az üveghordozó sajátságai 10
1.2.2 A hullámvezető üvegréteg kialakítása 11

2 NYOMÁS ÉS ÁRAMLÁSI SEBESSÉG MÉRÉSE **15**

2.1 ÉSZLELT JELENSÉGEK 15
2.1.1 Folyási sebesség 15
2.1.2 Deformáció 17
2.1.3 Nyomás 18
2.2 ELMÉLETI MAGYARÁZAT 20
2.2.1 Lehajlási modell 20
2.2.2 Érzékenységi számolások 22
2.2.3 A fejezet összefoglalása 22

3 FEHÉRJE REZISZTENS FELÜLETEK **23**

3.1 FOSZFORILKOLIN-POLIURETÁN (PCPUR) 24
3.1.1 PCPUR vékonyréteg előállítása 25
3.1.2 PCPUR felületek karakterizálása 26
3.2 OWLS MÉRÉSEK PCPUR MÓDOSÍTOTT SZENZOROKON 27
3.2.1 A kísérletek és a felhasznált anyagok leírása 27
3.2.2 Az eredmények értelmezése 28
3.3 POLI-L-LIZIN-*G*-POLI-ETILÉN-GLIKOL (PLL-*G*-PEG) 30
3.3.1 PLL-g-PEG szerkezete 31
3.3.2 PLL-g-PEG bevonatok 32
3.3.3 OWLS mérések PLL-g-PEG módosított szenzorokon 36
3.3.4 A fejezet összefoglalása 43

4 SEJTEK ÉS FELÜLETEK KÖLCSÖNHATÁSA **44**

4.1 SEJTEK MÉRÉSE OWLS-AL 44
4.1.1 A mérés menete 45
4.1.2 A csúcsok félértékszélesség változása 46
4.2 TOXIKOLÓGIAI MÉRÉSEK 46
4.2.1 Az OWLS mérések kalibrálása a CLSM képek segítségével 47
4.2.2 Kritikus toxin koncentráció meghatározása 48

5 MINTÁZAT A HULLÁMVEZETŐ FELÜLETÉN **50**

5.1 MINTÁZATOK KÉSZÍTÉSE ÉS KARAKTERIZÁLÁSA 50
5.1.1 Mintázatkészítés a mikrocsatornák segítségével 50
5.1.2 I-ToFSIMS mérések 51
5.2 OWLS MÉRÉSEK MINTÁZOTT FELÜLETEKEN 52
5.2.1 A mérőműszer továbbfejlesztése 53
5.2.2 Pásztázó mérések sejtmintázatokon 55

6 ÖSSZEFOGLALÁS **58**

7 TÉZISEK **60**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **66**

IRODALOMJEGYZÉK **68**

ABSTRACT

Integrated optical bioaffinity sensing is the most sensitive technique available for the study of bio-molecule adsorption at surfaces. This paper involves the development of a grating coupler waveguide sensor, instrumentation and software used in optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) applications.

Using the high sensitivity of this technique, a novel optical pressure and flow-rate sensor setup, which was based on the bending of the waveguide under mechanical stress, was designed.

The development of novel surface modification methods extended the applications of the OWLS technique to new areas, such as the study of protein adsorption on polymer surfaces. The OWLS technique was shown to be very useful in testing protein resistant polymers. It was possible to perform a protein adsorption study of different phosphorylcholine containing polyurethanes by spin-coating a thin layer of the polymers onto the waveguide. The layer formation of the copolymer of poly-L-lysine grafted poly-ethylene-glycol (PLL-g-PEG) was monitored by the OWLS technique, and it was also shown that surfaces treated with this polymer demonstrated excellent protein resistance.

The interaction of cells with surfaces is an intensively studied area in biomaterials research. A platform was developed based on the OWLS technique for the on-line study of the cells interacting with surfaces and bio-molecules. For example, the technique was applied for the study of the spreading kinetics of human osteoblast like cells and their responses to toxic substances.

The introduction of the scanning capability to the measuring system extended the area of OWLS applications to the investigation of patterned surfaces. Microfluidic networks were used to pattern waveguides with PLL-g-PEG. Protein adsorption and cell attachment was only observed on the non-coated areas of the surface.

The use of the OWLS technique in the study of polymers, micro-patterned surfaces and cell-surface interactions is an important development since it opens the door to a wide array of novel applications.

BEVEZETÉS

A XX. század első felét a fizika rendkívül gyors fejődése jellemezte. Megszületett az általános relativitás elmélet és a kvantummechanika. Az emberiség az atomenergia korszakába lépett. Részecskegyorsítókat építettek, kutatóintézeteket hoztak létre. Az 50-es évektől megindult az informatikai forradalom, ami még ma is tart. Már úgy hozzászoktunk, hogy az lenne a furcsa, ha a számítógépek nem lennének sokkal gyorsabbak és kisebbek évről évre. A 80-as évek végén pedig a világháló kialakulásával a kommunikációs forradalom indult útjára. Mára az ezek segítségével kialakult jóléti társadalmakban egyre nagyobb súlya van az egészségügynek és a hozzá kapcsolódó iparágaknak, mint például a gyógyszeripar és a biotechnológia. A számítógépeken létrehozott óriási adatbázisok, a kutatócsoportok között felgyorsult kommunikáció révén esély mutatkozik bonyolult biológiai folyamatok egy mélyebb szintű megértésére és szabályozására. A molekuláris genetika rohamléptekkel halad előre, annyira, hogy már erkölcsi és filozófiai határokat is megközelített, éppúgy, mint a fizika a század elején. A biotechnológia termékeit: gyógyszereket, gyógyászati segédeszközöket, implantátumokat, analitikai módszereket stb. naponta használjuk, ezért nem véletlen, hogy az egyik legjobban finanszírozott kutatási területnek számít. Az élő szervezettel való érintkezés újfajta kihívást jelent az anyagkutatásnak. A bioanyagok fogalom magában hordozza a biokompatibilis, azaz a szervezetből káros reakciót nem kiváltó anyagokat éppúgy, mint a bioszenzorokon használt, a szervezet valamelyik részével reagáló anyagokat. A bioanyagok és az élő szervezet kölcsönhatásakor a lényeges felismerési reakció a határfelületen zajlik le. Sokféle hasonló reakciót figyelhetünk meg az élő szervezetben. Hormonok keringenek a vérben és amikor elérkeznek a célsejtig, adszorbeálódnak a sejtmembránra és esetleg keresztül hatolnak rajta. Valami hasonló történik a sejt belsejében. Fehérjék adszorbeálódnak a lipid-membránokra vagy a DNS fonalakra és váltanak ki további reakciókat. Hagyományosan a biológiában a kutatók homogén oldatban vizsgálták a reakciókat, az utóbbi időben azonban új kísérleti lehetőségek lehetővé teszik számunkra, hogy a reakciókat a határfelületen vizsgáljuk pontosabban és kényelmesebben, mint a homogén oldatban. Ezek a módszerek a fény visszaverődésén alapulnak. Isaac Newton a XVII. század végzett kísérletei során felfedezte, hogy a teljes visszaverődés fázisváltozása az üveg/levegő határánál lévő vékony réteg jelenlététől függ [1]. Pontos visszaverődési méréseket csak az 1950-es években hajtottak végre. Nagyjából ugyanabban az időben terjesztették ki a Fresnel-féle

visszaverődési törvényeket olyan határfelületekre, ahol más anyagból való vékony réteg van jelen. Ebben az időszakban fejlődtek ki különféle mérési módszerek is, mint például az ellipszometria és a felületi plazmon rezonancia. A 70-es években jött létre az integrált optika. Lassan indult útjára, de villámgyors fejlődés jellemzi; az egész világon optikai hullámvezetőket alkalmaznak a telekommunikáció terén. A másik alkalmazási területe, amely még nem annyira fejlett mint a telekommunikációé, azonban most egyre inkább előtérbe kerül: a szenzoroké. A különbség a telekommunikációs integrált optikával szemben az, hogy az optikai hullámvezető a távközlés szolgálatában környezetétől elszigetelt, ezzel szemben a sík hullámvezetőnek a szenzor-technológia terén nagyon érzékenyen kell reagálnia környezete változásaira. Ez a feladat határozza meg a szenzorok számára alkalmazott hullámvezető felépítését is. Az integrált optikai szenzor egy kényelmes megvalósítása a fényt optikai ráccsal hullámvezetőbe becsatoló szenzor (**O**ptical **W**aveguide **L**ightmode **S**pectroscopy). Néhány száz nanométer vastagságú sík hullámvezetőben csak meghatározott számú diszkrét fénymódus lehetséges. Ezeknek a módusoknak energiaértékei (azaz a fázissebesség vagy az ***N*** effektív törésmutató) diszkrét sorozatot alkotnak, amelyek mérésével információt szerezhetünk a felületen lezajló reakciókról. Egy ilyen integrált optikai szenzornak, a hozzá tartozó mérőműszernek és szoftvernek a fejlesztésében vettem részt a doktori munkám első két évében a Mikrovákuum KFT-nél. Az itt végzett munkát, aminek eredménye a világon egyedül nálunk gyártott szenzor lett, foglalja össze az 1. fejezet. A szenzor stabilitásának, érzékenységének vizsgálatakor derült ki, hogy általa lehetőség van új elven alapuló, nagyon pontos nyomás és folyási sebesség detektálásra. A mechanizmus megértésével sikerült a már megfigyelt, de eddig nem értett jelenségeket is megmagyarázni. Erről szól a 2. fejezet.

A legalapvetőbb adszorpciós szenzor az, amelyik minden molekulát, vagy bármilyen egyéb részecskét jelez, amely az oldatból (vagy a levegőből) a határfelületre érkezik és ott is marad. Bármilyen bonyolult is az oldat összetétele, egy jó szenzorban a határfelületnek olyan tulajdonságokkal kellene rendelkeznie, hogy a határfelülethez csak egy molekula-fajta ragadjon. Ez a szelektivitás kihívás a szenzor-felületeket tervező vegyészek számára. Svájcban, a Zürichi Műszaki Egyetem Felülettechnológiai Laboratóriumában végzett kutatásaink során sikerült olyan felületeket kifejlesztenünk, amelyek az eddigieknél jobban csökkentik a fehérjék adszorpcióját (3. fejezet). Ezeknek a módosításával pedig elérhető közelségbe került a remélt szelektivitás megvalósítása.

Toxikológiai teszteket már régóta végeznek. Ez volt a feladata például az ún. étekfogóknak a középkorban, akik a nagyurak asztalánál megkóstolták az ételt, nehogy megmérgezhessék őket. Ma már az állatkísérletek is a közvélemény egyre erősebb ellenállásába ütköznek, ezért szükség van új, *in-vitro* toxikológiai módszerekre, amiknek segítségével ezeknek száma minimálisra csökkenthető. A sejtek és a felület kölcsönhatásait vizsgálva kifejlesztettünk egy toxikológiai szenzort, ahol az integrált optika érzékenységét felhasználva a sejtek alakváltozását követjük nyomon nagy pontossággal. (4. fejezet)

A szenzortechnológia fejlődésével együtt jár a miniatürizálás. A modern analitikai műszerekben ma már 10×20 cm-en 5-10000 szenzort kellene elhelyezni. Ez csak úgy lehetséges, ha a felületeket mikrométer skálájú struktúrával látjuk el. Erre egy ígéretesnek látszó módszer a mikrokontakt nyomtatás (microcontact printing), illetve a mikrocsatorna hálózatok (microfluidic networks) alkalmazása. Erről szól a dolgozat 5. fejezete.

A bioanyagkutatás sokoldalúsága, az ismeretek szerteágazósága miatt ezen a területen eredmények elérésére csak több kutató és többfajta tudományág összefogásával van lehetőség. Az itt bemutatott eredmények eléréséhez is kellettek azok a fizikus, vegyész, mérnök, anyagkutató és biológus kollégák, akikkel a négy év során együtt dolgoztam. Amennyire lehetett igyekeztem hivatkozni rájuk és az általuk elvégzett munkára a dolgozat megírásakor.

1 INTEGRÁLT OPTIKAI HULLÁMVEZETŐ SZENZOROK

Ebben a fejezetben egy rövid áttekintést szeretnék nyújtani a dolgozat többi részében használt integrált optikai szenzor (OWLS) működési elvéről, illetve előállításának módjáról. Ez a technika a 80-as évek végén alakult ki a többi teljes visszaverődésen alapuló felületi adszorpció mérési eljáráshoz (felületi plazmon rezonancia (SPR), teljes belső reflexió (TIR)) hasonlóan. Az OWLS esetében a szenzor két fő részből áll: egy üveghordozóra felvitt vékony, nagy törésmutatójú hullámvezető rétegből, és az ezen lévő optikai rácsból, aminek segítségével lehet a hullámvezető módusait gerjeszteni. A gerjesztés He-Ne lézer segítségével történik, és csak két jól meghatározott beesési szög esetén jön létre. Ez a két beesési szög megváltozik, ha a felületen vagy annak közelében bármilyen törésmutató változás történik. Ezt kihasználva, egy mérőműszer segítségével a beesési szögek folyamatos nyomon követésével kvantitatív információt nyerhetünk a felületen lezajló adszorpciós folyamatokról. A technika érzékenysége lehetővé teszi például a fehérjék adszorpciójának vizsgálatát 1 ng/cm^2 (kb. egy század monoréteg fehérje) pontossággal.

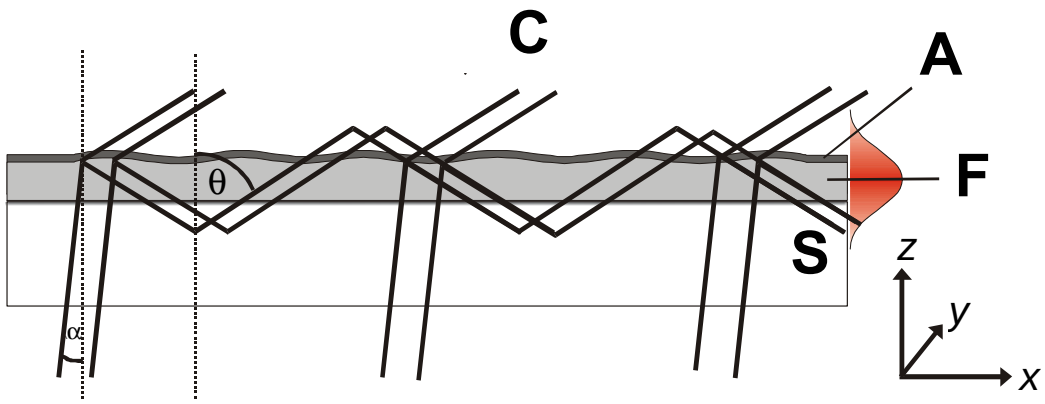
1.1 Elméleti háttér

1.1.1 Elektromágneses hullám terjedése hullámvezetőben

Két dielektrikum (legyenek F és J, törésmutatójuk n_F és n_J) határfelületére θ_F szögben beeső fénysugár megtörik, és a jól ismert Snellius-Descartes törvénynek megfelelően θ_J szögben halad tovább (1).

$$n_F \sin\Theta_F = n_J \sin\Theta_J \qquad \textbf{(1)}$$

Ha $n_F > n_J$, akkor $arcsin(n_J / n_F) < \theta_F < \pi/2$ beesési szög esetén teljes visszaverődés történik a határfelületen. Már Newton feltételezte, hogy a fény visszaverődéskor behatol a ritkább közegbe, mielőtt "visszafordulna". Ha az F közeg egy vékony, nagy törésmutatójú dielektrikum, akkor benne a teljes visszaverődések sorozatából irányított fényterjedés, azaz hullámvezetés jöhet létre. Ilyenkor a fény a hullámvezetőben terjed, de közben minden egyes visszaverődéskor "bele-belekóstol" a hullámvezetővel érintkező közegbe az 1. ábrán látható módon.



1. ábra: A hullámvezető sugároptikai szemléltetése. Az egyes rétegek: **S** üveghordozó (törésmutatója n_C~1.52) , **F** hullámvezető filmréteg (törésmutatója n_F~1.78, vastagsága d_F~200nm), **A** az adszorbeálódott anyag (vastagsága általában 0-20nm), **C** a fedő réteg. (Az ábra jobb oldalán az elektromágneses tér intenzitás eloszlása van szemléltetve 0-ad rendű módus estén.)

A teljes visszaverődéshez szükséges szögben haladó fény előállítására többféle megoldás létezik, az 1. ábra az optikai ráccsal történő becsatolást mutatja, amikor a felületen lévő optikai rács által diffraktált fény indul el a hullámvezetőben. A sorozatos visszaverődéskor a fény önmagával interferál. Csak abban az esetben történik hullámvezetés, amikor a becsatolt fény önmagával fázisban van, azaz egy „cikk-cakk" során $2\pi m$ ($m=0,1,\ldots$) fázistolást szenved. A nyíllal jelzett x irányban a fény terjedését a hullámszámvektor $k_{x,F}$ komponense szabja meg, aminek segítségével bevezethetjük a hullámvezetőre jellemző N effektív törésmutató mennyiséget (2).

$$N = \frac{k_{x,F}}{k} = n_F \sin\theta \qquad \left(= n_0 \sin\alpha + \frac{l\lambda}{\Lambda} \right) \tag{2}$$

Ahol λ a lézer hullámhossza, $k=2\pi/\lambda$ a vákuumbeli hullámszám. (n_0 a levegő törésmutatója, l a diffrakció rendje, Λ pedig a rácsállandó.)

Abban az esetben, amikor a törésmutató csak a z irányban változik és nincs adszorbeálódott anyag a felületen a Maxwell egyenleteket megoldva kiszámolhatjuk a fázistolást a transzverz elektromos (TE) és a transzverz mágneses (TM) hullámokra. Így kapjuk meg a három rétegű hullámvezető egyenleteit (3).

$$d_F k\sqrt{n_F^2 - N^2} - \arctan\left[\left(\frac{n_F}{n_C}\right)^{2\rho}\frac{\sqrt{N^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}}\right] - \arctan\left[\left(\frac{n_F}{n_S}\right)^{2\rho}\frac{\sqrt{N^2 - n_S^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}}\right] = \pi m \quad \textbf{(3)}$$

A transzverz elektromos polarizációra ρ=0 , a transzverz mágnesesre pedig ρ=1 vonatkozik. A (3) egyenlet egy feltétel a hullámvezetésre, az N effektív törésmutatóra. N-en keresztül azt mutatja meg, hogy milyen θ szögben kell elindítani a fényt a hullámvezetőben ahhoz, hogy az módusként terjedjen. A (2) egyenlet zárójelben lévő része pedig összefüggést teremt a θ és az optikai rácsra történő α beesési szög között.[2]

1.1.2 Hullámvezető módusok

Az effektív törésmutató (2) definíciója alapján csak az alkalmazott fény λ hullámhosszától, Θ terjedési irányától és a hullámvezető n_F törésmutatójától függ. Az előzőekben láttuk, hogy a fény csak az effektív törésmutatóra kapott (3) feltétel teljesülése esetén terjed a hullámvezetőben. Ennek segítségével, adott hullámhosszúságú lézert használva, az α (és ezen keresztül a Θ) szög mérésével információt kapunk a hullámvezető és környezetének törésmutató viszonyairól. Azt már az előzőekben láttuk, hogy ahhoz, hogy a hullámvezetés létrejöjjön az kell, hogy két visszaverődés után a fény önmagával fázisban maradjon, azaz a fáziseltolódásra teljesülnie kell a következő feltételnek (4):

$$2d_F k\sqrt{n_F^2 - N^2} + \Phi_{F,S} + \Phi_{F,A,C} = 2\pi m \quad \textbf{(4)}$$

Itt Φ-k az egyes határfelületeken (lásd 1. ábra) történő fázisugrást, m pedig a módus számát jelöli. Vékony ($d_A << \lambda$) adszorbeálódott réteg esetén a Fresnel-féle reflexiós koefficiensek felhasználásával a (4) feltétel a következő alakra hozható, amit a négy rétegű hullámvezető linearizált módusegyenletének hívunk:

$$\pi m = k\sqrt{n_F^2 - N^2}\left(d_F + \frac{n_A^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2}\left[\frac{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_A}\right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_F}\right)^2 - 1}\right]^{\rho} d_A\right) - \tag{5}$$

$$- \arctan\left[\left(\frac{n_F}{n_C}\right)^{2\rho}\frac{\sqrt{N^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}}\right] - \arctan\left[\left(\frac{n_F}{n_S}\right)^{2\rho}\frac{\sqrt{N^2 - n_S^2}}{\sqrt{n_F^2 - N^2}}\right]$$

(TE hullámokra ρ=0, a TM hullámokra ρ=1.)

Az egyenletben szereplő n_F , n_C, n_S törésmutatók és a hullámvezető d_F vastagsága ismert (azaz mérhető) mennyiségek, N az effektív törésmutató, n_A és d_A pedig a hullámvezetőre adszorbeálódott réteg törésmutatója illetve vastagsága, amikre kíváncsiak vagyunk. A jelölések megértését megkönnyíti az 1. ábra. Ha két különböző módusra megmérjük az N effektív törésmutatót, akkor az így kapott két egyenletből n_A és d_A kiszámítható. Ennek a két paraméternek a segítségével a Feijter képlet [3] felhasználásával pedig kiszámíthatjuk az egységnyi felületre adszorbeálódott tömeget:

$$M = d_A \frac{n_A - n_C}{dn/dc} \tag{6}$$

Itt *dn/dc* a felületre adszorbeálódott anyag törésmutatójának koncentrációtól való függésére jellemző és független precíziós törésmutató módszerrel (általában interferométerrel) mérhető. Értéke a pedig fehérjék többségére univerzális és gyakorlatilag állandó: 0,182 cm^3/g. Ennek a jelentősége az, hogy kalibráció nélkül tudunk más mérésekkel összevethető mennyiséget mérni.

1.2 Az Integrált Optikai Hullámvezetők Készítése

A hullámvezető réteg olyan speciális üvegréteg, ami homogén anyagú, törésmutatója (n=1.6-2.2) nagyobb mint a közönséges üvegé (1.45-1.51), rétegvastagsága kis ingadozást (5-10%) mutat az érzékelő hossza mentén.

1.2.1 Az üveghordozó sajátságai

Az üvegréteg hordozójaként üveglemezt alkalmaznak. Ez általában bórszilikát üveg, amelynek magas a BaO és Al_2O_3 tartalma, alkálimentes, szintetizált anyag. Ilyen célra alkalmas a DESAG cég AF45-ös, vagy a CORNING cég 7059-es üveglemeze. Ezek

felületi érdessége 0.1-0.3 nm, hőállóságuk kitűnő és alacsony a hőtágulási együtthatójuk.

1.2.2 A hullámvezető üvegréteg kialakítása

Az üvegréteg fő alkotóeleme a SiO_2. A törésmutató n=1.6-2.2 értékének kialakításához viszont a SiO_2 alacsony n=1.45 törésmutató értékét meg kell növelni. Erre a célra a TiO_2 hozzákeverése igen alkalmas. Az üveghordozón a kiválasztott SiO_2-TiO_2 arányú, nagy törésmutatójú réteg előállítása történhet vákuumtechnikai módszerekkel, mint párologtatás, de leginkább porlasztás útján, vagy szól-gél oldatból centrifugálással, és a szól-gél oldatba mártott hordozó lassú kihúzásával.

Vákuumtechnikai módszerek

Mind a SiO_2, mind a TiO_2 olvadáspontja meghaladja az 1000°C-t. Vákuumban történő elpárologtatása, elporlasztása nem tartozik az egyszerű feladatok közé, s reprodukálható előállítása drága berendezéseket igényel.

- Elektronsugaras párologtatás

  Alacsony nyomásnál, körülbelül $6.6 \cdot 10^{-5}$ Pa ($5 \cdot 10^{-7}$ torr) értéknél a SiO_2 és a TiO_2 forrás megolvasztására az elektronsugaras technika célszerű. Mintegy 10kV-al gyorsított elektronok ütköznek a forrás felületébe, s párologtatják el az anyagot, ami az üvegszubsztráton csapódik le, s alakítja ki a hullámvezetésre alkalmas réteget. A TiO_2 és a SiO_2 szükséges arányának beállítása történhet egyfelől ezek adott keverékének, mint forrásnak az alkalmazásával, másfelől tiszta anyag forrásokat alkalmazva, s ezek elpárologtatási arányait biztosítva.

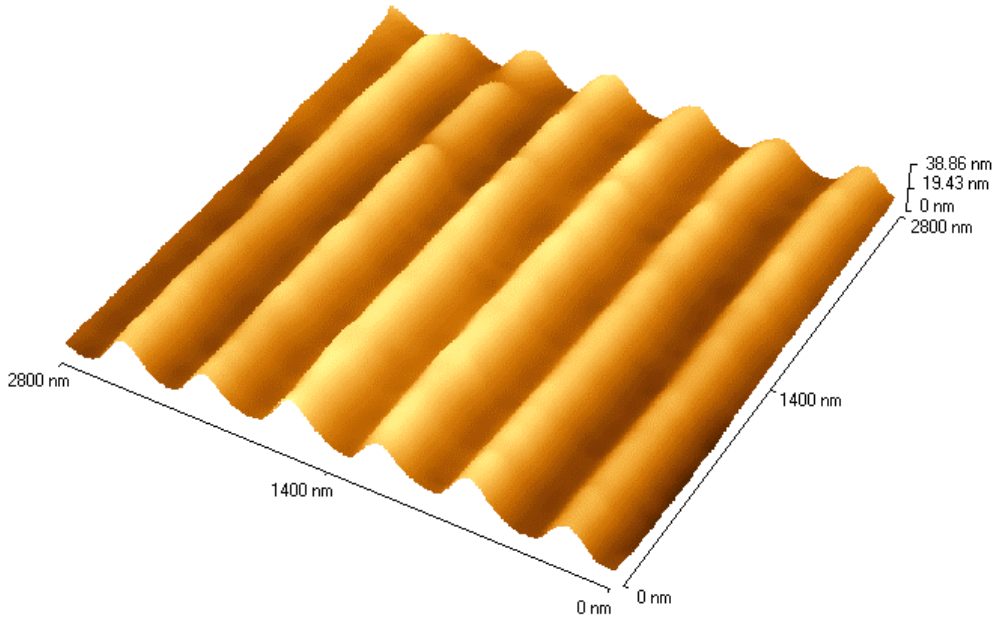
- Vákuumporlasztás

  A vákuumporlasztás során nem szükséges a SiO_2 és a TiO_2 megolvasztása. Egyenáramú, de adott esetben rádiófrekvenciás térrel felgyorsított ionok, többnyire Ar^+ ionok bombázzák a Si és Ti, vagy SiO_2 és TiO_2 target felületét, ahol az anyag illékonnyá válva csapódik le a szubsztrát felületén. A porlasztás néhány torr Ar nyomásnál és kisebb energiafelhasználással végezhető el, mint az elektronsugaras párologtatás.

Mind a két vákuumtechnikai módszer esetén az érzékelő aktív részét, a lézer becsatolására szolgáló optikai rácsot, fotolitográfiai és kémiai maratással, vagy holografikus képalkotás és ion (plazma) marás segítségével kell kialakítani a SiO_2-TiO_2 réteg leválasztása előtt.

Szól-gél technika

A kolloid kémiából ismeretes a "szól" elnevezés, ami kolloid méretű részecskék folyadékban történő diszpergálását jelenti. A kolloid méretű anyagok az 1-100 nm-es tartományba eső szilárd részecskék, amelyek mindegyike 10^3 - 10^9 atomot tartalmaz. Amikor a szól viszkozitása jelentősen növekedni kezd, ez a gyakorlatban, vagy a folyadékfázis részleges elveszítése folytán, és/vagy a szilárd kolloid részecskék polimerizációja miatt következik be. Porózus, szilárd-szerű, képlékeny anyag keletkezik, amit "gél"-nek nevezünk. Az 1980-as években "újra felfedezték" a szól-gél folyamatokat. Így magas hőmérsékletű, rosszul keverhető üvegolvasztások helyébe lépett a sokoldalúan felhasználható szól-gél technológia. Az alacsony hőmérséklet és a különféle sóoldatok alkalmazása mellett lehetőség van sok komponensű, atomi méretekben homogenizált üvegrendszerek, vékony rétegek kialakítására. Egyszerű módszerrel a Si-alkoxid és a Ti-alkoxid oldatok az adott törésmutató biztosításához szükséges arányainak összekeverése útján atomi méretekben homogenizált Si-Ti szól-gél kolloid oldatokat nyerhetünk. Az üveghordozó felületén kialakított réteg szárítása és hőkezelése után a rétegben az előre tervezett SiO_2-TiO_2 arány alakul ki. [4]



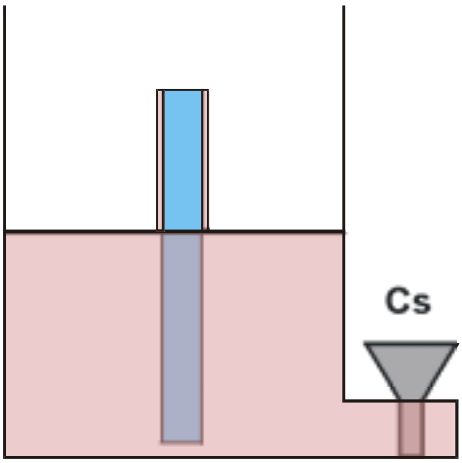
2. ábra: A Mikrovákuum KFT-nél gyártott szenzor felületén lévő optikai rácsról AFM -el készített kép

Ebben az esetben a rács kialakítása a képlékeny, frissen képződött szól-gél rétegben "formázással", azaz a mestermaszkba való nyomatással történik [5]. Az ezt követő hőkezelések véglegesítik a bordázatot, amelynek mélysége 5-20nm, szélessége 2mm. Azért, hogy α-ra kényelmesen mérhető értékeket kapjanak általában kétféle rácssűrűséget alkalmaznak az ilyen szenzorokat használó Artifitial Sensing Instruments (ASI) által forgalmazott BIOS-1 berendezésekben: 2400 vonal/mm és 1200 vonal/mm (2. ábra).

- Hullámvezető réteg kialakítása centrifugálással

Nagy fordulatszámú (1000-10000 fordulat/perc) és gyorsan (a másodperc tört része alatt) felpörgő centrifugát alkalmazva lehetőség van a vákuummal, vagy mechanikailag rögzített üveglapon homogén Ti-Si tartalmú, egyenletes vastagságú szól-gél réteg kialakítására. A hordozó felületén lévő mechanikai szennyezők inhomogenitásokat eredményeznek, ezért mind a felhasznált szól-gél oldatokat, mind az üveghordozót nagymértékben meg kell tisztítani. Természetesen a munkavégzés környezetének, a levegőnek is megfelelően por és szennyezés mentesnek kell lennie.

- A hullámvezető réteg kialakítása oldatból történő "kihúzási" technikával



3. ábra: Sematikus ábra a réteg oldatból leeresztéssel történő előállítására. Cs: az oldat leeresztéséhez használt csapot jelöli

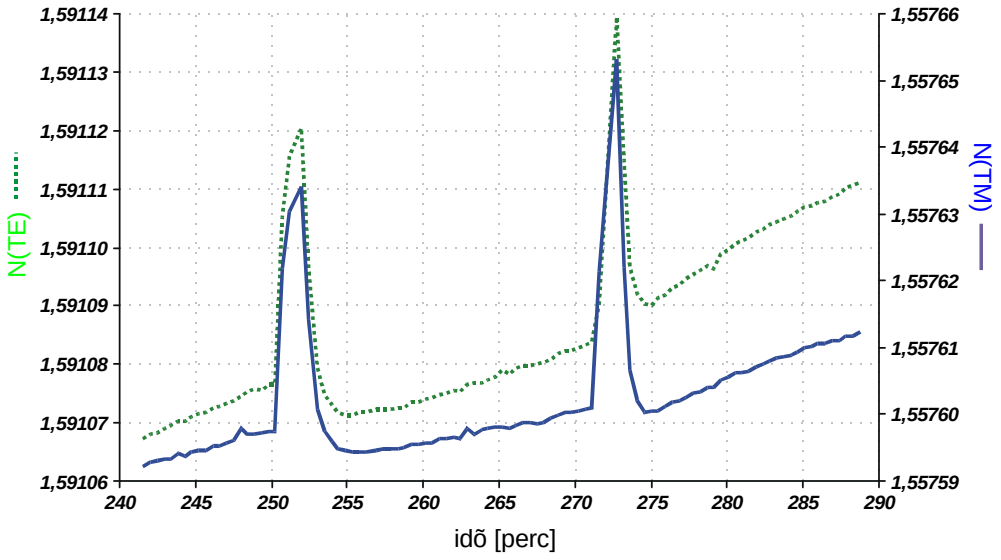
A réteg kialakítása nagyon egyszerű készüléket igényel, amint azt a 3. ábra sematikus rajza is mutatja. A réteg kialakítása történhet akár az üveglemez lassú (kb. 1.5 mm/s) egyenletes sebességű kihúzásával, akár a szól-gél oldat turbulencia mentes leeresztésével a "Cs" csapon keresztül, a szubsztrát fix rögzítése mellett. A korábban említett rétegkészítési eljárásokkal szemben ezzel a módszerrel az üveglemez mindkét oldalán kialakul a hullámvezető üvegréteg [1].

2 NYOMÁS ÉS ÁRAMLÁSI SEBESSÉG MÉRÉSE

2.1 Észlelt jelenségek

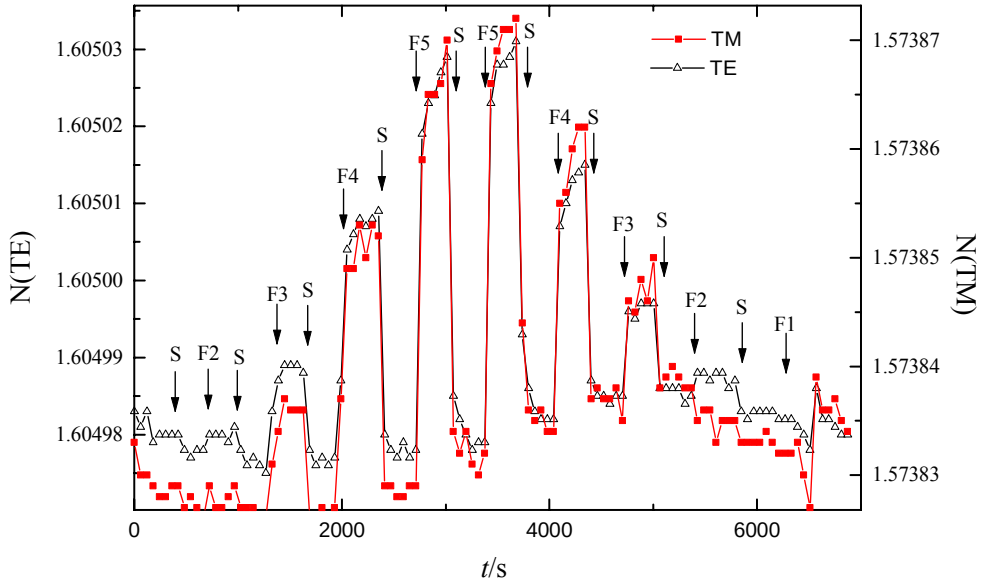
2.1.1 Folyási sebesség

A BIOS-1 felhasználói körében ismert jelenség volt, hogy a küvettában folyási sebesség megváltoztatása a mért effektív törésmutatóban változást okoz. Az injekcióval történő folyadékcsere során például a 4. ábrán látható kis csúcsok jelennek meg.



4. ábra: Injekcióval történő folyadékcsere hatására lecsengő csúcsok jelennek meg a mérési görbén

A jelenség részletes leírása és az alábbi kísérletek megtalálhatók Dr. Csúcs Gábor doktori disszertációjában [6]. Mivel a folyási sebesség változtatása befolyásolja a mérést, ezért fontos a mechanizmus megértése, és az ebből adódó hibák nagyságrendjének megállapítása. Majdnem minden kísérlet során ugyanis előfordul, hogy a folyadék áramlási sebességét változtatni kell, esetleg meg is kell az áramlást állítani. Az effektus részletes vizsgálata során Dr. Csúcs egy kísérletsorozatot hajtott végre, ahol desztillált vizet pumpált egy megtisztított csipre rögzített küvettán keresztül különböző, 30 µl/perc és 480 µl/perc közötti folyási sebességgel. Egy ilyen kísérletet mutat be a 5. ábra.



5. ábra: A folyási sebesség változás hatása a mért effektív törésmutatóra. Az S nyilak a folyadék megállítását, az F1-F5 nyilak pedig 30,60, 120, 240 illetve 480 µl/perc folyási sebességre kapcsolást jelzik.

Ebben az esetben egy ASI 2400 -as csipet és a lamináris áramlást biztosító hosszúkás küvettát használt. Jól látható hogy a folyási sebesség növelésével szisztematikusan növekszik a mért effektív törésmutató. Az eredmények összegzését a 2.1 táblázat tartalmazza.

2.1 táblázat: A táblázat az N_{TM} és az N_{TE} változását mutatja 10^{-6} egységekben.

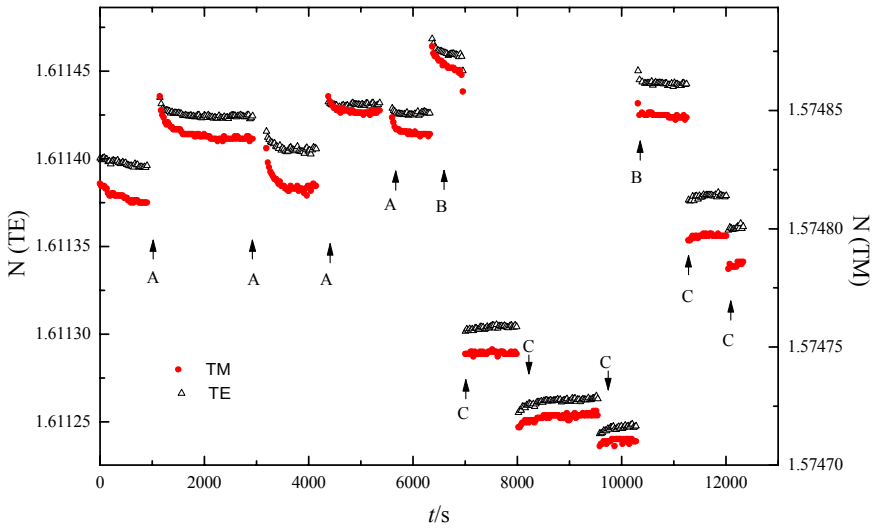
csip/küvetta	Effektív törésmutató változás különböző folyási sebességekre									
	30 µl/perc		60 µl/perc		120 µl/perc		240 µl/perc		480 µl/perc	
	TE	TM	TE	TM	TE	TM	TE	TM	TE	TM
1400/lamináris	-	-	-	-	-	-	-	6	-	11
2400/lamináris	-	-	3	-	14	11	31	26	48	41
2400/kerek	-	-	-	-	-	-	5	3	9	8

Látszik, hogy az alacsony folyási sebességek nem befolyásolják a mérést illetve, hogy a különböző anyagból készült csipek, illetve a különböző geometriájú küvetták másként viselkednek. Az effektus a puffer választására nem érzékeny, mert desztillált víz helyett HEPES Z1 (10 mM HEPES, 8 M NaOH –val pH 7.4 –re titrálva) puffer használata ugyanarra az eredményre vezetett.

2.1.2 Deformáció

Ebben a részben a Dr. Csúcs Gábor által elvégzett szisztematikus mérés sorozat adataira fogok támaszkodni. Ő is BIOS-1 készülékkel dolgozott, és azt vette észre, hogy a küvetta rögzítésének módjától függően ugrások jelennek meg az effektív törésmutató görbéken. Mivel gyakran előfordulnak olyan alkalmazások ahol először nagy pontossággal meg kell határozni a hullámvezető szenzor optikai paramétereit, majd ki kell venni a műszerből, kémiai vagy egyéb módosítások után (pl. Langmuir-Blodgett film készítés) pedig visszatéve újra kell mérni, hogy a változást vizsgálni lehessen. A nagy pontosságú mérésből eredő rendkívüli érzékenység ugyanis elveszhet, ha nem tudjuk kiküszöbölni a ki- illetve berakáskor keletkező eltéréseket. A mérés a hullámvezető rétegben történő változásokra a legérzékenyebb, és a kapott adatok mindig a lézer által megvilágított 1 mm^2 rész átlagából adódnak. Ezért is fontos, hogy a műszerbe a hullámvezető helye precízen meg van szabva, de tizedmilliméternyi elmozdulások azért előfordulhatnak. Mivel, mint később látni fogjuk (33. ábra), a hullámvezető réteg a milliméteres skálán nem tökéletesen egyenletes (n_F és d_F változhatnak), ezek az apró elmozdulások is okozhatnak számottevő hibát. A szisztematikus mérés során az is kiderült, hogy nem csak a kivétel és berakás okozhatnak eltérést, hanem a rögzítőcsavar megszorításának mértéke is befolyásolja a mérést (6. ábra.).

A mérés ASI 1400-as, 16×48 mm-es csippel készült desztillált vízben, szobahőmérsékleten. Az **A** jelű nyilak a csip kivételének és nitrogénnal történő megszárítása utáni visszatételének időpontjait jelzik. A **B**-vel jelölt nyilak pedig a csavar megszorításának, míg a **C**-vel jelöltek a csavar meglazításának idejét mutatják. A kivétel és berakás véletlenszerű ugrásokat okoz, aminek nagyságrendje $20 \cdot 10^{-6}$. Ugyanakkor a rögzítőcsavar megszorítása szisztematikusan növeli, lazítása pedig csökkenti a mért effektív törésmutatót.

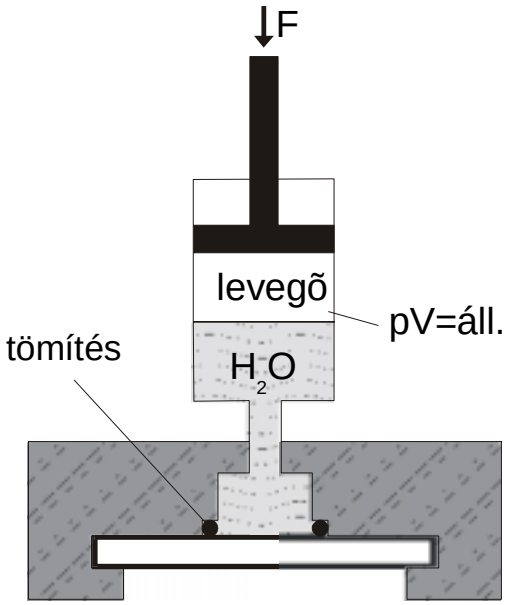


6. ábra: Mechanikai zavarok hatása az effektív törésmutatóra Nyilak: A a csip ki- és betétele, B a küvetta rögzítőcsavarjának megszorítása, C a rögzítőcsavar meglazítása.

Az eltérés a csavar laza és a szoros állapota között akár $250 \cdot 10^{-6}$ is lehet. Ez a változás pedig egy nagyságrendbe esik egy fehérje monoréteg által okozott változással, ezért fontos, hogy a csavar szorosságát reprodukálhatóan lehessen állítani. A nagy pontosságot igénylő kísérleteket pedig lehetőleg úgy kell tervezni, hogy ne kelljen mérés közben a csipet mozdítani.

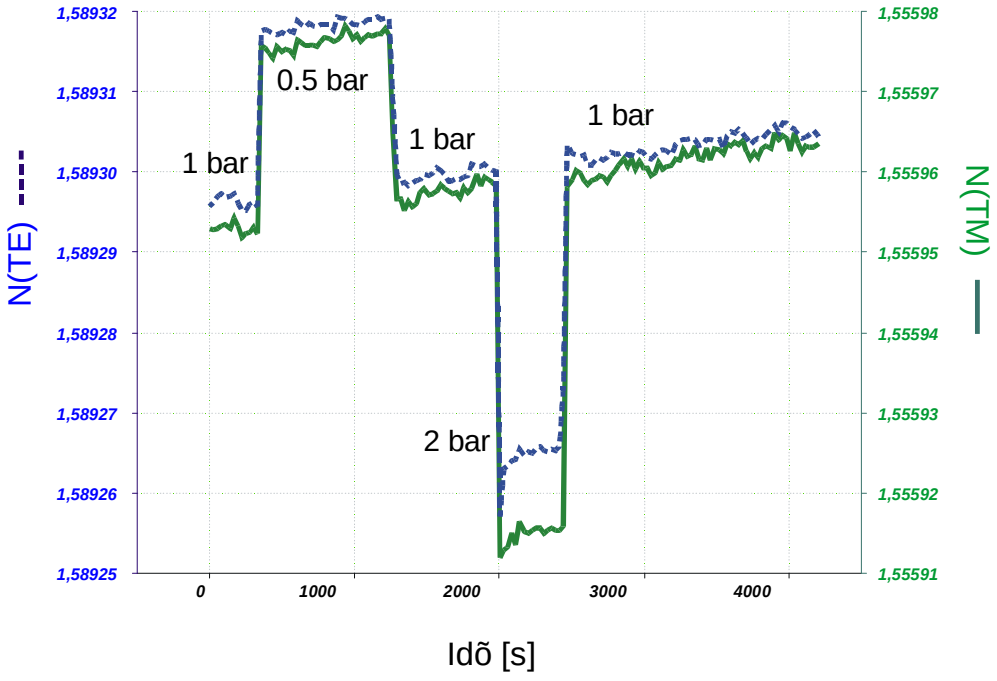
2.1.3 Nyomás

Gyakran az OWLS mérések során a folyadékok cseréjét fecskendővel végezzük. Mivel ilyenkor a folyási sebességek igen nagyok (300ml/h), ezért a mérési görbéken itt is mindig csúcsokat kapunk. Az egyik ilyen méréskor véletlenül fordítva (az érzékeny oldallal lefelé) helyeztük a műszerbe a hullámvezetőt. Természetesen a várt adszorpciós görbét nem kaptunk, viszont folyadékcserekor jelentkeztek a csúcsok, csak az ellenkező irányban. A jelenség vizsgálatára a 7. ábrán látható egyszerű összeállítással méréseket végeztünk.



7. ábra: Mérési összeállítás a nyomásváltozás hatásainak vizsgálatára

A zárt folyadékrendszerben a nyomást dugattyú helyzetének megváltoztatásával tudtuk változtatni, az értékeket pedig a pV=állandó összefüggés alapján a dugattyúban lévő levegő térfogatából számoltuk. Mivel a mérések során nagy tisztaságú desztillált vizet használtunk, ezért a látható ugrások csak mechanikai hatásoknak tudhatók be (8. ábra). Itt még érdemes megjegyeznünk, hogy ha a szenzorokat érzékeny részükkel lefelé helyeztük a műszerbe, akkor a 8. ábrán látható ugrások az ellenkező irányban történtek.

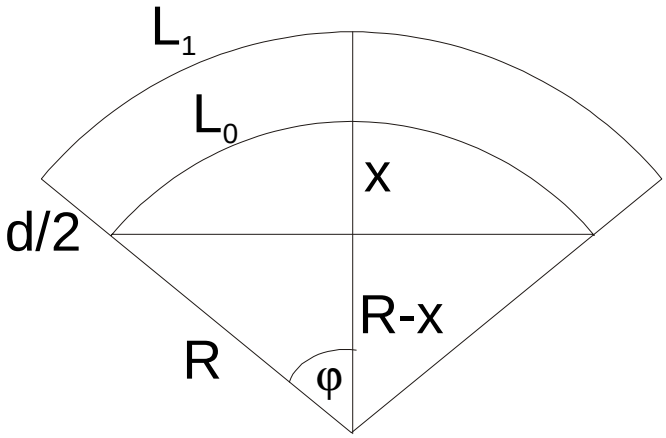


8. ábra: Nyomásváltozás hatása a mért effektív törésmutatókra

2.2 Elméleti magyarázat

Az elméleti magyarázathoz a kulcsot Dr. Szendrő Istvánnak (Mikrovákuum KFT) az ötlete adta. Ő javasolta, hogy vizsgáljuk meg, hogy a hullámvezető esetleges meghajlásából következő rácsperiódus változás okozhat-e ilyen effektusokat.

2.2.1 Lehajlási modell



9. ábra: A szenzor nyomásváltozás hatására történő alakváltozása

A szenzor kismértékű (φ <<1) meghajlásakor a 9. ábrán látható jelöléseket használva a szenzor felületének a közepéhez képesti relatív megnyúlására a következő egyenlet teljesül:

$$\frac{L_1}{L_0} = \frac{R + d/2}{R} = 1 + \frac{d}{2R} \qquad \textbf{(7)}$$

Itt $2L_0$ a szenzor hossza, L_1 jelöli a megnyúlt réteg hosszát, d a szenzor vastagságát, R pedig az érintő kör sugarát. Tudjuk továbbra még, hogy:

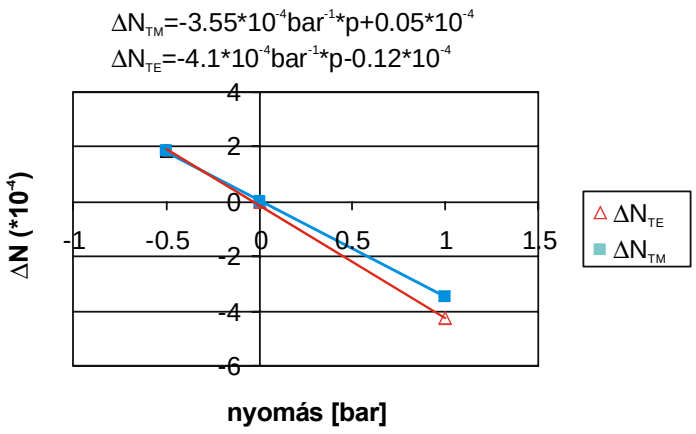
$\frac{L_0}{R} = \frac{\varphi}{\pi}$, illetve, hogy $\frac{R-x}{R} = \cos\varphi$. Ezekből (8) felhasználásával, kis szögekre (kismértékű x lehajlásra) a relatív megnyúlásra kapjuk:

$$\frac{L_1}{L_0} = 1 - \frac{d}{4L_0^2\pi}x \qquad \textbf{(8)}$$

A (6) egyenletbe behelyettesítve, és a jól ismert lehajlási képletet felhasználva a mért effektív törésmutató változás kismértékű deformáció (x/L_0<<1) hatására történő megváltozására a következő összefüggés adódik:

$$\Delta N = -\frac{\lambda}{\Lambda_0}\frac{d}{L_0^2\pi^2}x = \frac{\lambda}{\Lambda_0}\frac{1}{4\pi E}\frac{L_0}{ad^2}Ap := \frac{\lambda}{\Lambda_0}Dp \qquad \textbf{(9)}$$

Itt E a Young modulus, a=12mm a szenzorcsip szélessége, A=12mm^2 a nyomott felület nagysága, p pedig a nyomás (L_0=4mm, λ=632.816nm, Λ_0=416nm, d=0.5mm). A mért effektív törésmutató változásokat a nyomás függvényében ábrázolva (10. ábra) jól látszik a (9) szerinti lineáris függés.



10. ábra: A mért effektív törésmutató nyomástól való függése lineáris

A 2.1.1 részben ismertetett folyási sebességtől való függés és a lehajlási modell között a kapcsolatot a Bernoulli törvény adja:

$$p + \frac{1}{2}\rho v^2 = áll. \qquad \textbf{(10)}$$

Ugyanígy a 2.1.2 részben látott rögzítőcsavar megszorítás illetve lazítás mérésre való hatása is érthetővé vált, hiszen az alátámasztási ponttól függően a csavar megszorításakor a szenzor szintén görbül.

2.2.2 Érzékenységi számolások

A 10. ábra szerint 1 bar nyomásváltozás ~$4\cdot10^{-4}$ effektív törésmutató változásnak felel meg. Ez a műszer érzékenységének 2-400 szorosa, így változtatás nélkül lehetséges <5mbar pontossággal 0-4 bar közötti méréseket végezni. A (9) összefüggésben szereplő konstansok kis mértékű megváltoztatásával azonban könnyen elérhető lehet az akár 0,05mbar pontosság, hiszen $L_0'=10L_0$, $a'=0.5a$, $d'=0.5d$ választással $D'=80D$ adódik arányossági tényezőnek, azaz 80 szoros pontosság érhető el.

Természetesen a méréshatár számolásakor feltételeztük, hogy a mérésre ható egyéb paraméterek (hőmérséklet, páratartalom, felszíni réteglerakódás stb.) nem változnak. A hőmérséklet kivételével ezeknek a hatásoknak a kiküszöbölésére a legjobb módszer a szenzor felületének 200 nm-nél vastagabb, átlátszó védőréteggel történő bevonása.

2.2.3 A fejezet összefoglalása

Ebben a fejezetben egy szép példát láthattunk arra, hogy néha a kísérletezés közben tapasztalt „kis” zavaró jelenségek megértése új alkalmazások felfedezéséhez vezethet. Az észlelt jelenségek: a mérési adatok folyási sebességtől, csavar szorosságtól való függésének szisztematikus kimérése után újfajta mérési összeállítás tervezésével lehetőség volt a jelenségek nyomásfüggésre való visszavezetésére. A mechanizmus megértését segítette a lehajlási modell elkészítése, aminek segítségével a technika nyomásdetektálásra való alkalmazhatósága is kiderült. Mivel ez nem a szokásos elektronikus úton történő nyomásmérés, ezért egy svájci nyomásdetektorokat gyártó cég (Tecan AG) érdeklődik az esetleges szabadalmaztatási lehetőségek iránt.

3 FEHÉRJE REZISZTENS FELÜLETEK

A modern orvostudomány fejlődésével lehetőség nyílt arra, hogy az emberi testbe különböző funkcióval bíró szerkezeteket ültessünk be. Ezek természetesen érintkeznek a szövetekkel, így a vérrel is. Fontos tehát, hogy az emberi szervezet hogyan válaszol az idegen anyag jelenlétére. A modern biokompatibilis anyagoktól azt várják el, hogy célspecifikus fehérjemegkötő tulajdonságuk révén a szervezetet a kívánt válaszreakcióra késztessék. Ilyenek például a csontképződést elősegítő kalcium tartalmú polimerek.

Ebben a fejezetben a biokompatibilis anyagok egy olyan csoportjával foglalkozunk, amelyeknél fontos szerepe van a fehérjerezisztens tulajdonságuknak. Az idegen anyagok szervezetbe kerülésekor bizonyos fehérjék adszorpciója az első lépés a nem kívánt kilökődési reakció kiváltásához. Egy másik fontos probléma: a trombózis kialakulásának veszélye jelentkezik a véráramba kerülő szerkezetek, pl. érprotézisek használatánál. Ezek falára kötődő aktiváló fehérjék hatására a vérlemezkék és vörösvérsejtek vérrögöt alakíthatnak ki, ami leválva a szűkebb keresztmetszetű erekben elzáródást, trombózist okozhat. Elengedhetetlen tehát olyan mesterséges anyagok használata, amelyek megakadályozzák a trombózis kialakulását előidéző aktiváló fehérjék kötődését.

A bioszenzorok világában is fontos probléma a nem specifikus fehérjeadszorpció. A szervezetből származó minták (pl. vér) összetettsége miatt igen nehéz megbízható, specifikus méréseket végezni. Általánosan használt stratégia, hogy fehérjerezisztens anyagokból kiindulva, azok módosításával – kötőcsoportokkal való ellátásával – érjük el a kívánt specificitást.

A probléma megoldására többféle módszer létezik. A felületeket indirekt módon fehérjerezisztenssé lehet tenni kis méretű irreverzibilisen kötődő fehérjékkel (általában albuminnal) történő bevonással. Egy másik megoldás a biológiai membránokhoz hasonló anyagok előállítása. Erre láthatunk egy példát a fejezet első részében. A polietilénoxid vízhez hasonló tulajdonságait kihasználva szintén nagyon jó fehérjerezisztens felületek készíthetők. Egy ilyen anyagról, a polilizin-*g*-polietilénoxidról szól a fejezet második fele.

3.1 Foszforilkolin-poliuretán (PCPUR)

A bioanyagokhoz sorolt anyagok között egyre növekvő szerepet kapnak a természetes és a szintetikus polimerek. Ez utóbbi osztályba tartozó anyagok nagy előnye a sokféleségük. Fizikai, kémiai és mechanikai tulajdonságaik széles skálán változtathatók, és könnyen lehet formázni illetve bevonatként alkalmazni őket. Az egyetlen ok, ami megnehezíti széles körű orvosi alkalmazásukat, hogy gyakran nem elég biokompatibilisek, például trombogenezist vagy kilökődési reakciókat válthatnak ki. Az ilyen reakciók oka az *in vivo* alkalmazások során pedig általában a felület és a fehérjék kontrollálatlan kölcsönhatásában keresendő. Ezért fontos az olyan biokompatibilis szintetikus polimerek előállítása, amelyek felületén a fehérjékkel illetve ezáltal a sejtekkel való kölcsönhatást szabályozni tudjuk. Ennek egyik lehetséges módja az olyan polimerekből való kiindulás, amelyek minimálisra csökkentik, vagy meggátolják a felületi fehérje adszorpciót (pl. PHEMA, PVA, PEO)[7,8,9,10,11]. A következő lépésként pedig ezeknek a megváltoztatásával speciális tulajdonságokkal lehet a felületeket ellátni. Ezt a stratégiát követve először olyan polimert terveztünk, ami a foszfolipidek poláros részét, foszforilkolint (PC) tartalmaz, és ezáltal szerkezetében hasonlít az eritrociták külső membránjához. Chapman és Nakabayashi kísérletei kimutatták, hogy a PC csoportok kopolimerizá-ciójával készült anyagok nagy mértékben csökkentik a vérben megtalálható fehérjék (albumin, γ-globulin, fibrinogén, fibronektin, von Willebrand faktor stb.) felületi adszorpcióját [12,13,14,15,16,17]. Ennek magyarázatát ők abban látták, hogy hipotézisük szerint a poláros PC csoporthoz kapcsolódó lipidmolekulák egy sejtmembránhoz hasonló réteget képeznek a polimer felületén. A lipidek ugyanis kis méretükből adódóan előnyt élveznek a kompetitív adszorpció során, így kötődésük megakadályozhatja a később érkező fehérjék adszorpcióját. A PC koncentráció fokozásával tovább csökkenthető a fibrinogén és egyéb koaguláció faktorok felületi adszorpciója, ami végül a vérlemezkék adhéziójának és aktiválódásának a gátlásához vezet [18,19,20]. A polimer alapjául szolgáló poliuretán-kémia előnye, hogy hemokompatibilis, és könnyen kezelhető, ezért is alkalmazzák az orvostudományban széles körben érprotézisek, mesterséges szervek és egyéb vérárammal kapcsolatba kerülő eszközök készítésére. Az első PC csoportokat tartalmazó poliuretán polimereket Chapman fejlesztette ki kollégáival [21], és a közelmúltban Cooper és kutatócsoportja kimutatták, hogy az ilyen felületeken csökkent a baktérium adhézió mértéke. Vegyész kollégám, Dr. Laurence Ruiz ezekre a kísérletekre alapozva kifejlesztett egy új

foszforilkolin tartalmú poliuretán vegyületet, aminek vékony bevonatként való alkalmazásával a hordozó felületére nem kötődnek a fehérjék, és így a sejtek sem. A fehérjeadszorpció mértékének megállapításához integrált optikai hullámvezetőt használtunk, a sejtek kötődését pedig neuron sejtkultúrában vizsgáltuk.

3.1.1 PCPUR vékonyréteg előállítása

A PCPUR polimereket négyféle monomerből szintetizáltuk oldatban történő polimerizációval. A glicerofoszforilkolin (GPC), 1,2-butándiol, glicerol és hexametilén diizocianát (HDI) monomerekből képződő polimer vízben nem oldódik, könnyen alakítható és foszforilkolin (PC) csoportokat tartalmaz. A PC tartalom, ami a GPC monomerből jön azért fontos, mert csökkenti a felület fehérjemegkötő képességét. A HDI monomer a szénhidrát részeket biztosítja, ami által a polimer vízben nem lesz oldható. A butándiol és a glicerol pedig a GPC oldatba viteléhez fontos, illetve szerepük van a polimer méretének növelésében is. A kezdeti glicero-foszforilkolin koncentráció változtatásával kétféle foszforilkolin tartalmú polimert állítottunk elő [23]. Ezeknek a készítéséhez használt monomerek mennyiségét foglalja össze a 3.1. táblázat.

3.1. táblázat: A PCPUR189 és a PCPUR167 polimerek készítéséhez használt monomerek mennyisége, a végső PC koncentráció (a foszfortartalomból számolva) és az átlagos molekula tömeg (fényszórásos kísérletből).

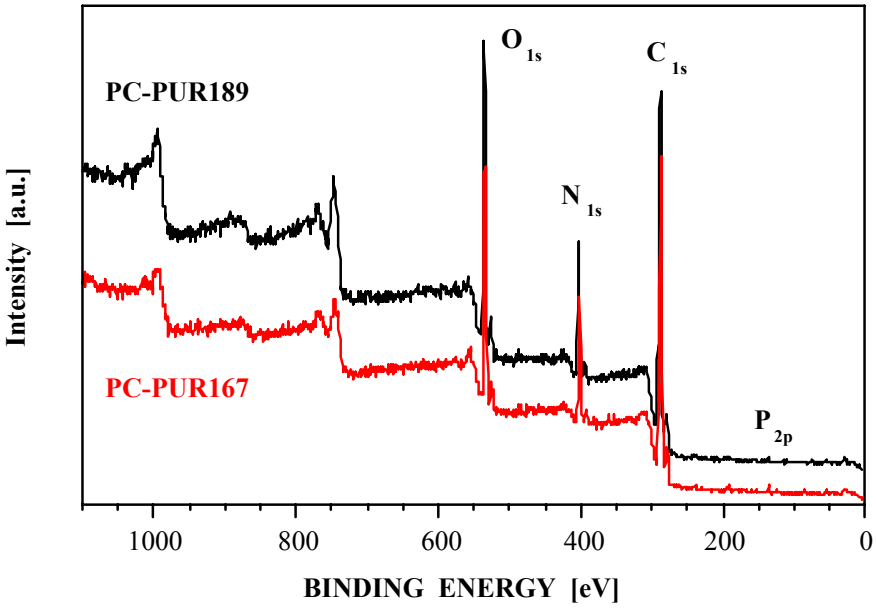
Monomer	PCPUR189	PCPUR167
GPC	5.4 mol%	6.8 mol%
1,2-Butándiol	42.8 mol%	40.5 mol%
Glicerol	2.1 mol%	1.5 mol%
HDI	50.3 mol%	50.5 mol%
Végső PC konc.	3.4 mol%	4.3 mol%
Molekula tömeg	500000 g/mol	70000 g/mol

A felületanalizáló műszerekhez és a sejtkultúrás kísérletekhez használt mintákat úgy készítettük, hogy 40 μl 5% (w/v)-os PCPUR etanolos oldatot centrifugáltunk termikusan oxidált szilícium hordozóra 2000 fordulat/perc sebességgel 60 másodpercig, majd 24 órát szárítottuk vákuumban 55-60 °C-on. A fehérjeadszorpciós OWLS kísérletekhez pedig a $Si_{0.4}Ti_{0.6}O_2$ ASI 2400μV hullámvezetőkre (Mikrovákuum Kft, Magyarország) pörgettünk fel 40 μl 1mg/ml töménységű PCPUR oldatot szintén 2000 fordulat/perc sebességgel 60 másodpercig. Az így kapott réteget 3 napig szárítottuk nagy tisztaságú lamináris fülkében szobahőmérsékleten.

3.1.2 PCPUR felületek karakterizálása

A nedvesítési peremszög meghatározásához mindig 1 μl térfogatú nagy tisztaságú deionizált vízcseppet ($\sigma_{víz}$=71.3 mJ/m^2) használtunk. A felületre helyezett vízcsepp alakját CCD kamerával rögzítettük, majd a θ nedvesítési szöget a félempirikus $\theta=2/arctan(2h/d)$ Walliser féle képletből [22] számoltuk. (Ahol h a csepp magasságát, d pedig az átmérőjét jelöli.) A PCPUR167 polimer nedvesítési szöge 60°±3.5° ami mintegy 20 fokkal kisebb, mint a PCPUR189-é (81°±2.5°). Ez jól tükrözi, a polimernek azt a várt tulajdonságát, hogy a nagyobb foszforilkolin tartalomnak köszönhetően csökken a hidrofóbicitás.

A felület összetételének vizsgálatához PHI5500 állítható szögű röntgen fotoelektron spektrométert (angle-resolved x-ray photoelectron spectrometer, AR-XPS) használtunk [23] . A vákuumkamrában a nyomás 10^{-9} mbar volt, nem monokromatizált Mg (350 W) forrást, és a feltöltődés minimalizálására alacsony energiájú (< 20eV) elektron ágyút használtunk. A fotoelektronokat a felülethez képest 20°-os illetve 80° szögekben detektáltuk. Ahogy a 11. ábra is mutatja az atomi összetétel - a foszfor kivételével - mindkét polimer esetében közel egyforma. A foszfor koncentrációban a gyenge jel ellenére is szignifikáns eltérés mutatkozik: a PCPUR167 polimerben több foszfor van, ahogy vártuk.



11. ábra: A PCPUR189 és a PCPUR167 polimerek AR-XPS spektruma 80°-nál. A szemléletesség érdekében az egyik spektrumot feljebb toltuk.

3.2 OWLS mérések PCPUR módosított szenzorokon

A PCPUR mesterséges polimerek felületén a fehérjeadszorpció vizsgálatát OWLS technikával végeztük. Ehhez olyan ASI 2400µV $Si_{0.4}Ti_{0.6}O_2$ hullámvezetőket használtunk, amikre az előző részben részletesen leírt eljárással 10-20nm vastag PCPUR réteget készítettünk. Az extra réteg miatt szükség volt a szenzorcsip érzékenységének ellenőrzésére. A mérésekhez használt fehérjéket és lipidet úgy választottuk meg, hogy azok jól reprezentálják a vérben megtalálható biomolekulákat.

3.2.1 A kísérletek és a felhasznált anyagok leírása

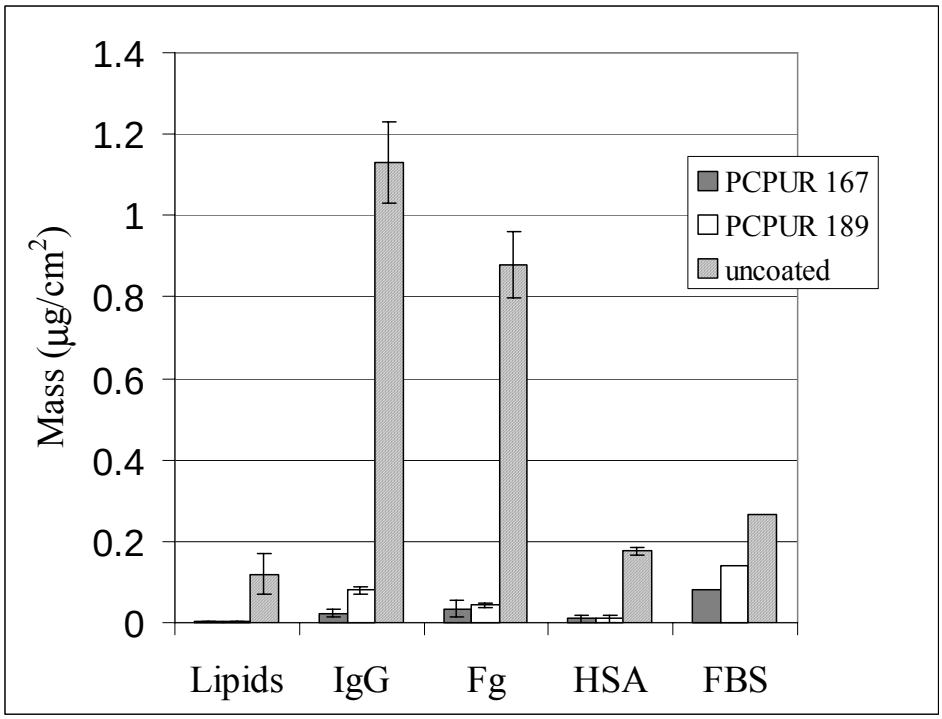
Az érzékenység ellenőrzését különböző törésmutatójú folyadékok: etanol, ultra tiszta desztillált víz és HEPES Z1 segítségével végeztünk el. A BIOS-1 műszerbe helyezett csipekre rögzített küvettán folyamatosan, 1 ml/h sebességgel pumpáltunk először desztillált vizet, majd HEPES Z1 puffert, végül etanolt. A kapott effektív törésmutató változásokat összehasonlítottuk a PCPUR réteg nélküli ASI2400µV csipeken mért adatokkal. Ezek a mérések azt mutatták, hogy a módosított csipek érzékenységének csökkenése elhanyagolható.

A fehérje és lipid adszorpciós kísérletek során a PCPUR réteggel ellátott, vagy a referenciának használt, nem módosított ASI 2400μV $Si_{0.4}Ti_{0.6}O_2$ hullámvezetőket a BIOS-1 műszerbe helyeztük és Kalrez küvettával rögzítettük. HEPES Z1 puffert folyattunk a küvettán keresztül 30-60 percig, amíg stabil alapvonalat nem kaptunk. Ezután váltottunk csak a fehérjét vagy lipidet tartalmazó oldatra, amit 60 percig folyattunk, majd újabb 60 perc HEPES Z1 puffer következett, hogy a deszorpciót is követni tudjuk. Az OWLS kísérletekben a következő biomolekulák adszorpcióját néztük:

- **Humán szérum albumin** (HSA), 5mg/ml (Sigma, Svájc)
- **Humán fibrinogén** (Fg), 1mg/ml (Sigma, Svájc)
- **Humán γ-globulin** (IgG), 5mg/ml (Roche, Svájc)
- **Lα -foszfatidilkolin XI-E** 100μM (A lipid oldatot friss tojás sárgájából kinyert lecitinekkel készítettük, és a pufferhez még 150 mM $CaCl_2$-ot adtunk.)
- **fetal bovine serum** (FBS, Gibco)
- Minden oldat készítéséhez **HEPES Z1** puffert használtunk.

3.2.2 Az eredmények értelmezése

A fehérje és lipid adszorpciós kísérletek összegzése látható a 12. ábrán. Mind a fehérjék, mind a lipidek adszorpciója lényegesen kisebb a PCPUR módosított felületeken, mint a referenciaként használt ASI 2400μV $Si_{0.4}Ti_{0.6}O_2$ csipeken.



12. ábra: Fehérje és lipidadszorpció a PCPUR189 és a PCPUR167 polimereken.

Az aktiváló fehérjékhez tartozó fibrinogén és a γ-globulin adszorpciójában több, mint 80 százalékos, míg a HSA illetve a lipideknél 95 százalékos csökkenést tapasztaltunk a PCPUR felületeken. Ez utóbbiak esetében az adszorbeálódott tömeg abszolút értéke kevesebb, mint 5 ng/cm^2, ami már a műszer érzékenységi határának nagyságrendjébe esik. HSA és fibrinogén azonos mértékben kötődik a két különböző PCPUR polimerhez, de kevesebb IgG-t találtunk a magasabb foszforilkolin tartalmú PCPUR167 esetében. Feltételezhető, hogy az IgG adszorpció jobban függ a foszforilkolin csoportok felületi koncentrációjától, még ilyen kis különbség esetén is. Ezt támasztják alá a fetal bovin szérummal végzett mérések is, ahol hasonló jelenséget tapasztalunk. A szérum összetettsége miatt azonban nehéz bármilyen pontos következtetést levonni a belőle a felülethez kötődő anyagokról. Ezek között valószínűleg a legnagyobb mennyiségben globulinokat találnánk, illetve lipideket és kis mennyiségű albumint a PCPUR felületeken, míg a kontroll hullámvezetőn főleg albuminból, vitronektinből és lipidekből álló réteg kialakulása várható.

Amikor megpróbáljuk megválaszolni a kérdést, hogy vajon miért rendelkeznek ilyen jó biokompatibilitással az ilyen típusú polimerek, komoly nehézségekbe ütközünk.

Ishihara és munkatársai már beszámoltak arról, hogy az általuk szintetizált 30 mol% foszforilkolint tartalmazó polimereknél fehérjeadszorpció csökkenést tapasztaltak [18,19,20]. Az viszont újdonságnak számít, hogy az általunk használt, kevesebb, mint 5 mol% foszforilkolint tartalmazó polimerek is hasonlóan viselkednek. Van der Heiden és társai méréseiben ugyanakkor a poliéteruretán alapú polimereknél a foszforilkolin tartalomnak nem volt hatása a fehérjeadszorpcióra [24].

Sokan a hidrofób és a poliuretán felületek viszonylagos passzivitását és jó hemokompatibilitását preferált albumin adszorpcióval szokták magyarázni [25], mi ellenben, csak nagyon kevés albumint találtunk. Ishiara és munkatársai magyarázataiban az szerepel, hogy a foszforilkolint tartalmazó polimerek fehérjerezisztens tulajdonsága a felületükön kialakuló lipidrétegnek köszönhető. [17,26,27,28,29] A mi méréseinkben viszont a természetes lipidek adszorpciójának is nagy mértékű csökkenését tapasztaltuk. Bár nem kizárható, hogy a molekulák speciális elrendeződése miatt bizonyos esetekben felerősödhet a lipidek adszorpciója (ún. mátrix effektus), a mi esetünkben azonban valószínűleg a hidratációs hatásoknak van nagyobb szerepe. A foszforilkolin csoportoknak ugyanis feltehetően hidratációt elősegítő és stabilizáló tulajdonságuk van [30,31,32,33], ami gátolja a fehérjék dehidratációját, és ezáltal adszorpciójukat is. Ez a magyarázat összhangban áll Ishiara és munkatársai legújabb eredményeivel is [34], amik azt mutatják, hogy ezeken a foszforilkolin tartalmú polimereken a fehérjék kevéssé képesek konformáció változásra, ami valószínűleg szintén a polimerek nagy szabad-víz tartalmának köszönhető.

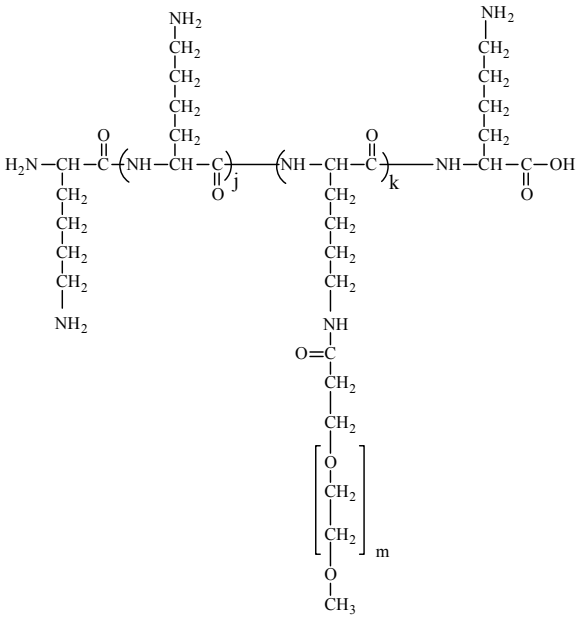
3.3 Poli-L-lizin-*g*-poli-etilén-glikol (PLL-*g*-PEG)

Már régóta ismert, hogy a fehérjék adszorpciója csökkenthető polietilén-glikol (PEG) felületre történő rögzítésével. [35] Ezt a PEG tartalmú hidrofil polimerek sok vízhez hasonló tulajdonságával magyarázzák.[36,37,38] A legtöbb alkalmazásban az egyik végén a felülethez való affinitással rendelkező funkciós csoporttal ellátott PEG-et kötnek különféle felületekhez.[39,40] Ebben a részben egy új PEG tartalmú polimerrel, a polilizin-*g*-polietilénoxiddal (PLL-*g*-PEG) fogunk foglalkozni, mert úgy tapasztaltuk, hogy egyszerűsége, gyors és kényelmes alkalmazhatósága, illetve kiváló fehérjerezisztens tulajdonsága kiemelik az eddig alkalmazott anyagok közül. Ezt a polimert Hubbell és munkatársai szintetizálták, és már megkezdődött a klinikai használata kardiovaszkuláris és tüdő műtétek sebesedési mechanizmusainak

szabályozására.[41] Mi alkalmaztuk elsőként fém-oxid felületek bevonására. Köztudott, hogy a fémből (főleg titánból) készült eszközök mennyire elterjedtek a biotechnológiában. A bioszenzorok egy része (például OWLS) is fém-oxid felületeket használ. Az általunk bevezetett módszer: a PLL-g-PEG használatával ezek is rendkívül fehérjerezisztenssé tehetők. Az alkalmazást fontossága miatt szabadalmaztattuk is. [42]

3.3.1 PLL-g-PEG szerkezete

A poli-L-lizin-g-polietilénglikol, mint a nevéből is kitűnik, egy ko-polimer. A 13. ábrán látható szerkezetének vázlata. A polimer gerincét a poliaminosav: a PLL alkotja, amihez az R-csoporton keresztül csatlakoznak a PEG oldalláncok, így egy fésűszerű szerkezetet kapunk. A molekula több paraméterét is állítani lehet: a PLL gerinc és a PEG oldalláncok hosszát, illetve a PEG oldalláncok sűrűségét. Az általunk vizsgált polimerekben a PLL gerinc molekulatömege 20 kD-tól 350kD-ig, a PEG oldalláncé pedig 2kD-től 5kD-ig terjedt. A lizin R-részében szereplő aminocsoport izoelektromos pontja 10 fölött van, ami miatt a PLL gerinc pozitívan töltött 10 alatti pH-n. A PEG oldallánc pedig vízmegkötő és vízhez hasonló tulajdonságai révén a polimer fehérje rezisztens tulajdonságát adja.



13. ábra: A PLL-g-PEG molekula szerkezete

A PLL-g-PEG a többszörösen pozitív töltése miatt erős ionos kötést hoz létre negatívan töltött felületekkel [43,44]. A fém-oxidok izoelektromos pontja általában 7 alatt van, így fiziológiás körülmények között (pH 7.4) negatívan töltöttek. Jó PLL-g-PEG adszorpciót tapasztaltunk nióbium-oxid, szilícium-oxid és titán-oxid esetében, illetve

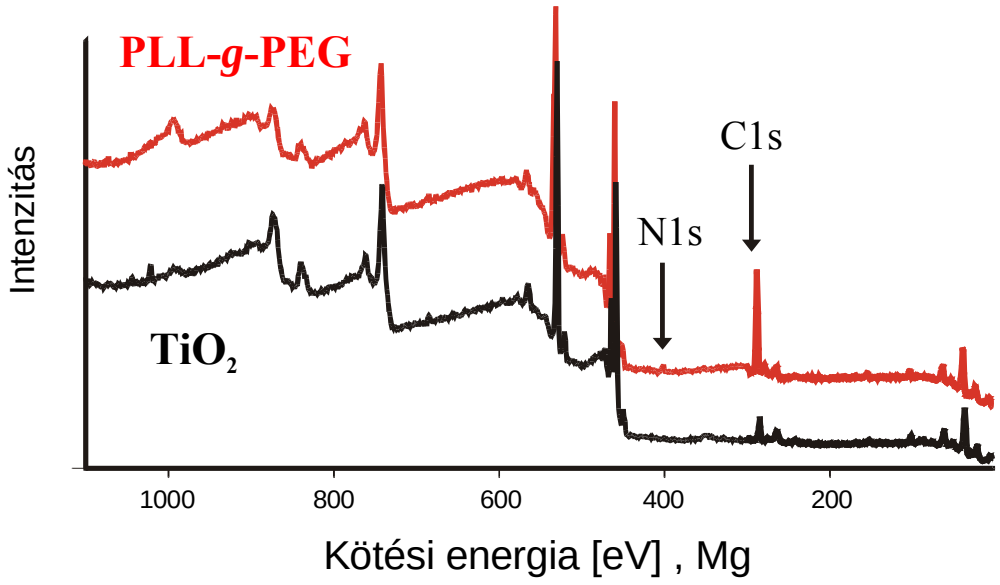
megfigyelhető volt a felületre kötődő polimer mennyiségének izoelektromos ponttól való függése (16. ábra). A PLL-g-PEG hasznos tulajdonságai közé tartozik, hogy vizes oldószerekben jól oldódik, így alkalmazása rendkívül egyszerű. Az általunk leggyakrabban használt PLL-*g*-PEG molekulatömege meghaladja az 1000kD-t, és kevesebb, mint 10 perc alatt stabil réteget képez a negatívan töltött felületeken.

3.3.2 PLL-g-PEG bevonatok

Egy új anyag használatakor, működési mechanizmusának vizsgálatakor sokat tanulhatunk a rendelkezésünkre álló felületi vizsgálatok eredményeiből. Ezeket a méréseket és a kiértékelést Reto Kesslerrel és Dr. Gregory Kenausisszal közösen végeztük. Szubsztrátnak húzott sík üvegre párologtatott 20 nm TiO_2 réteget használtunk, amit egyszerűsége, tisztasága és biológiai relevanciája miatt választottunk. A mintákat 10 percre 0.1mg/ml PLL-*g*-PEG-et tartalmazó HEPES Z1 oldatba helyeztük, majd kivételkor a pufferrel leöblítettük és nitrogénnel megszárítottuk. Az így kapott rétegeket XPS, ToFSIMS és FT-IR mérésekkel analizáltuk.

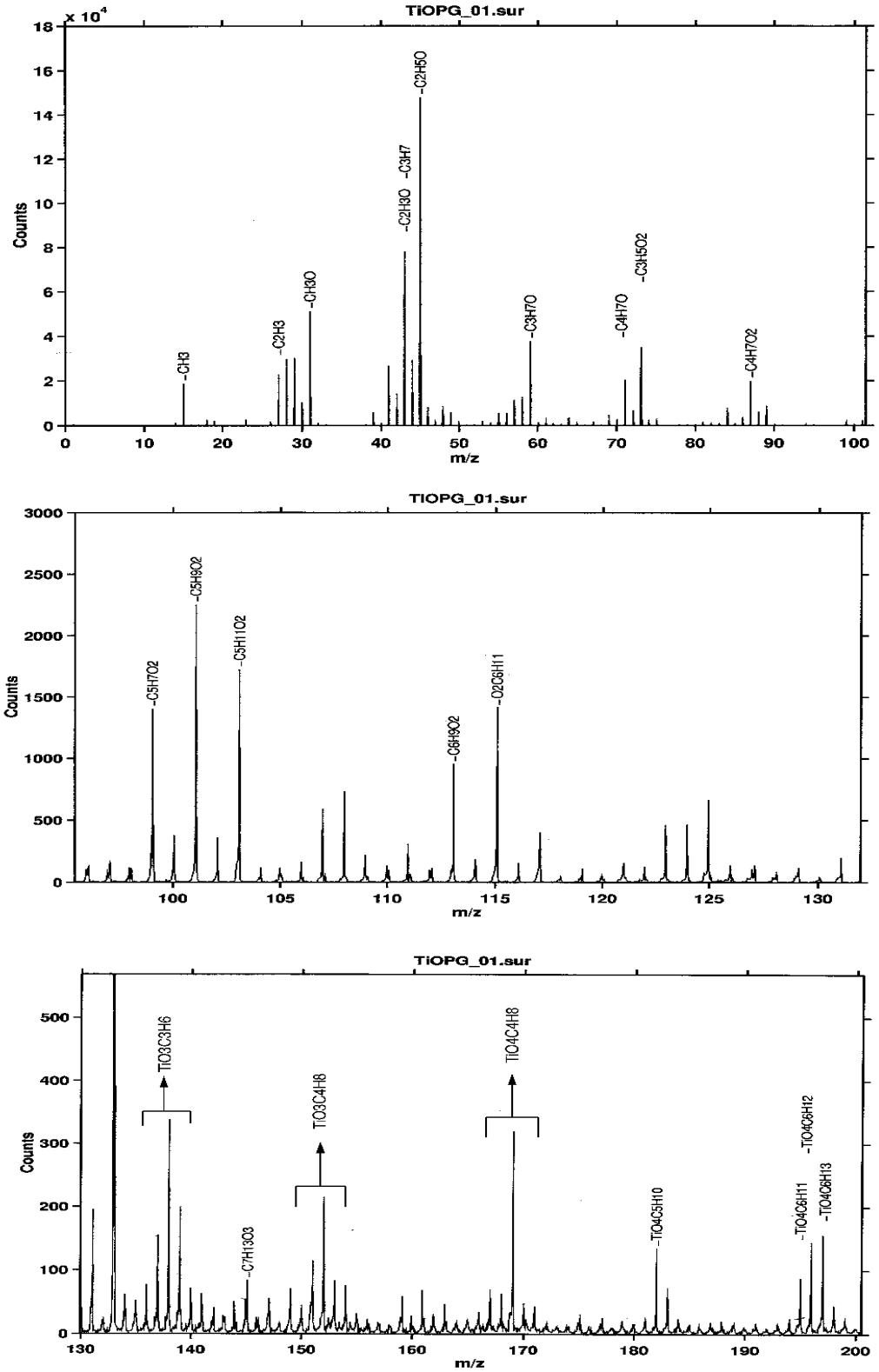
A nedvesítési peremszög mérését ConG2 (Krüss Co.) típusú készüléken végeztük. A vízcsepp növekedésekor leolvasott 40°±2° nedvesítési szög a várakozásoknak megfelelően a réteg hidrofil tulajdonságát mutatja, ami valószínűsíti a PEG oldalláncok meglétét a felületen.

Ezt az XPS mérések eredményei is egyértelműen alátámasztották. A PLL-*g*-PEG réteggel bevont minta referenciával való összehasonlítását mutatja a 14. ábra.



14. ábra: A PLL-g-PEG réteggel bevont és a referencia TiO_2 minta XPS spektruma

A két XPS spektrumon jól látszik, hogy a referencia mintán domináns Ti2p és O1s csúcsok a bevont mintán a PLL-*g*-PEG réteg árnyékoló hatása miatt kisebbek. A polimer magas szén és nitrogén tartalma miatt a C1s és N1s csúcsok a bevont mintán nagyobbak lettek. A referencia mintán ez utóbbi csúcsok megléte a szennyeződésre utal. Érdekes, hogy a jelenlevő viszonylag nagy felületi szennyezettség ellenére is a PLL-*g*-PEG bevonás után ezeknek a mintáknak is kiváló a fehérjerezisztenciája. Feltételezzük, hogy mivel a PLL-*g*-PEG több helyen kötődő óriásmolekula, ezért képes a szennyezett részek felett hidat képezve azokat is rezisztenssé tenni. Ez a tulajdonság alkalmazhatóbbá teszi a többi, nagy tisztaságot igénylő eljárásnál.



15. ábra: PEG-*g*-PLL bevonat TiO_2 felszínen (pozitív ToF-SIMS spektrum)

A ToFSIMS mérésekből (15. ábra) is érdekes dolgokat tanulhatunk. A kapott eredményeket három pontban foglalhatjuk össze:

- **Egyértelműen megállapítható a PLL-*g*-PEG réteg jelenléte a felszínen**

  A spektrumban sok domináns csúcs megfeleltethető a polietilén oldallánc valamelyik szegmensének. Például:

  $H_2C{=}OH^+$ (m/z=31)

  $CH_3{-}CH{=}OH^+$ (m/z=45)

  $CH_3{-}CH_2{-}O^+{=}CH_2$ (m/z=59)

  A különbség a domináns csúcsok között gyakran 14 vagy 16, ami egy újabb CH_2 csoport vagy egy oxigén molekula jelenlétére utal a láncban. (Pl. 31-45-59-73-89) Más csúcsok pedig egy H_2 elvesztése után kettős kötés kialakulását mutatják. Például:

  $CH_3{-}CH_2{-}O{-}CH_2{-}CH{=}OH^+$ (m/z=89)

  $CH_2{=}CH{-}O{-}CH_2{-}CH{=}OH^+$ (m/z=87)

- **A TiO_2 felületre jellemző csúcsok nem jelentkeznek a spektrumban**.

  A TiO_2 felületekre egyébként jellemző csúcsok, mint például a Ti (m/z=48), TiO (m/z=64), TiO_2 (m/z=81), vagy a Ti_2O_2 (m/z=128) nagyon gyengén jelentkeznek, vagy elvesznek a zajban ebben a spektrumban. Ez arra enged következtetni, hogy a felszín lefedettsége teljes.

- **A magasabb tömegszámú csúcsok között sok származik a TiO_2 és PEG részek rekombinációjából.**

  Például:

  $TiO_3C_3H_6$ (m/z=138)

  $TiO_3C_4H_8$ (m/z=152)

$TiO_4C_4H_9$ (m/z=169)

Ezek közül az első kettő esetben még a titán izotópjaihoz tartozó karakterisztikus mellékcsúcsok is megvannak, illetve meg lehet találni a már említett CH_2 vagy OH hozzáadásából származó csúcsokat is.

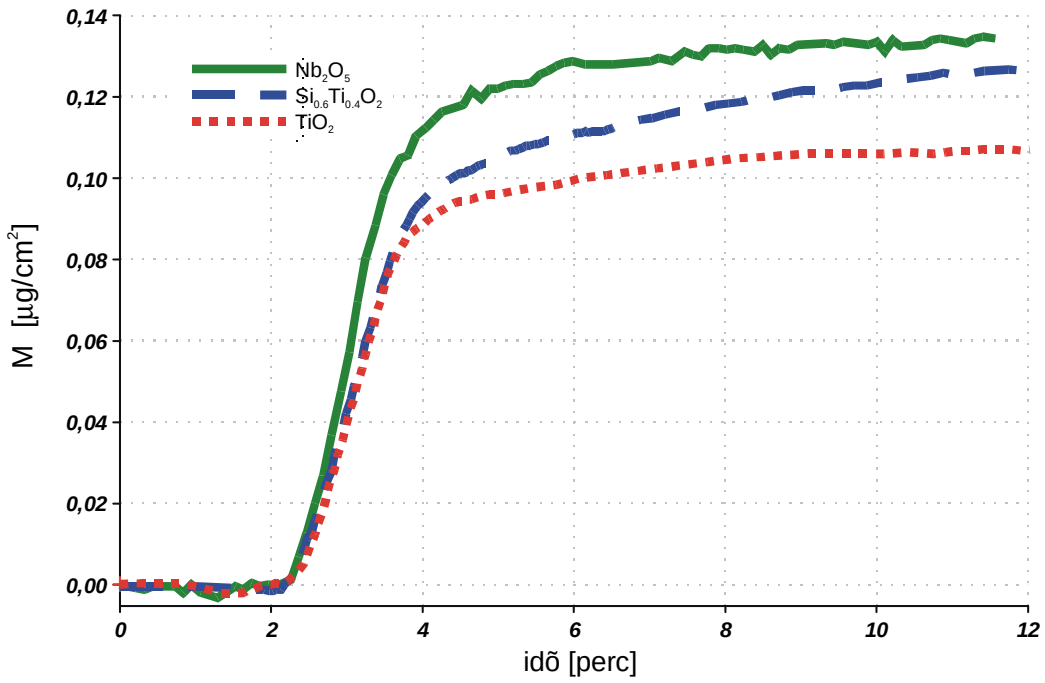
Az elvégzett mérések alapján képet alkothatunk arról, hogy a PLL-*g*-PEG milyen bevonatot képez a felszínen. Ezek szerint a mintának használt TiO_2 felületének jó részén szerves szennyeződést található, a fennmaradó részen pedig a PLL-*g*-PEG van. Ennek elrendeződése olyan, hogy a polilizin gerinc kötődik a felülethez, a polilizin oldalláncok pedig a felületre merőlegesen "fésűszerűen" helyezkednek el. A felület lefedettsége közel teljes, illetve a jó fehérjerezisztens tulajdonsága ismeretében feltételezzük, hogy a PLL-*g*-PEG óriásmolekulái áthidalva a szennyezett részeket a PEG oldalláncok olyan mértékű sűrűségét biztosítják, hogy azok között fehérjék már nem férnek el.

3.3.3 OWLS mérések PLL-g-PEG módosított szenzorokon

A dolgozat ebben a részében szereplő kísérleteket Dr. Gregory Kenausisszal, az oxidokon történő adszorpció vizsgálatát pedig Dr. Csúcs Gáborral közösen végeztük.

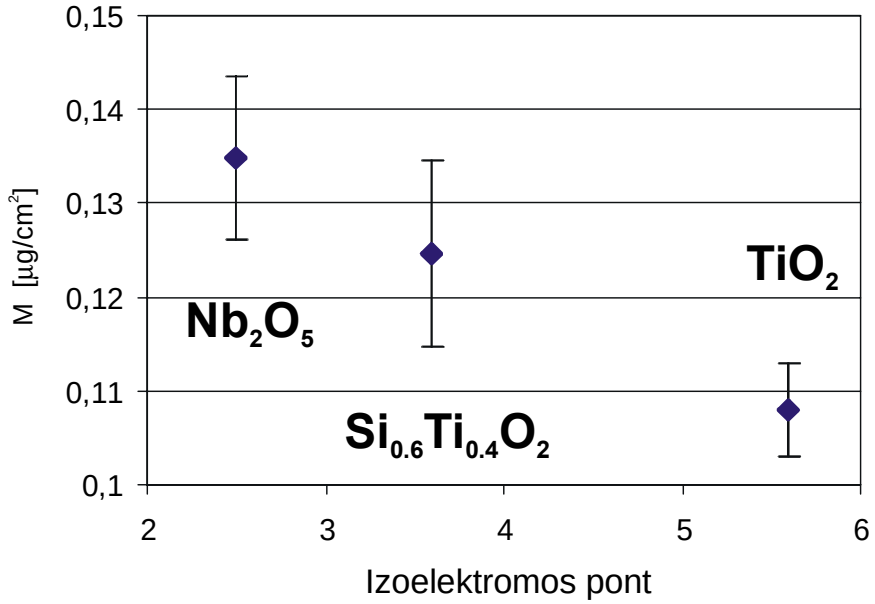
3.3.3.1 PLL-g-PEG adszorpció különböző oxid felületeken.

A PLL-g-PEG adszorpció kinetikájának vizsgálatához a kísérleteket a következő módon végeztük: Pufferként mindig HEPES Z1-t használtunk. A hullámvezető szenzort legalább egy napos pufferben áztatás után a BIOS-1 műszerbe helyeztük és Kalrez küvettával rögzítettük. Folyási sebességnek 10 ml/h -t választottunk, hogy a keveredési effektusok minél kevésbé zavarják az adszorpció kinetikát. A puffer folyatásával általában a mérés kezdete után 30 perccel már stabil alapvonalat kaptunk, ezután 10 percig 0.1 mg/ml PLL-*g*-PEG oldatot, végül ismét 10 percig puffert folyattunk a küvettán keresztül. A kinetika minél jobb követése érdekében az adszorpciós szakaszban csak a TM csúcsot mértük, így 5 másodperces időfelbontást kaptunk. Egy ilyen mérésre látunk példát a 16. ábrán. Szubsztrátként ASI 2400µV



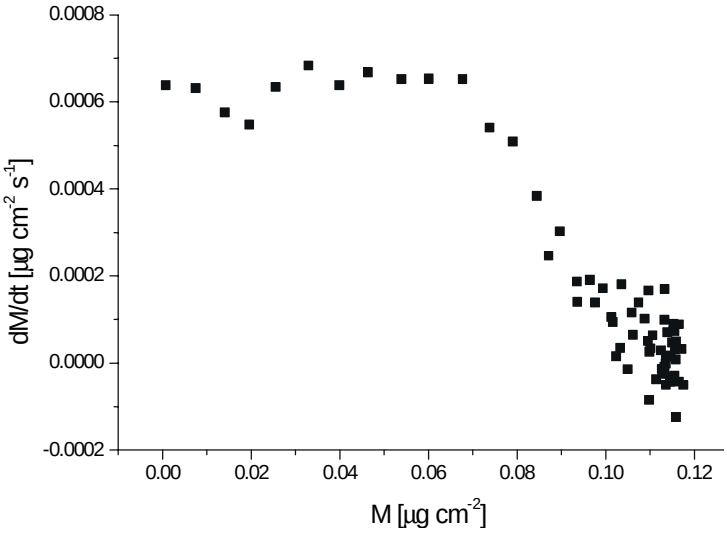
16. ábra: PLL-g-PEG réteg kialakulása fém-oxid felületeken

csipet használtunk bevonat nélkül, illetve a felületére porlasztott 10-12 nm nióbium-oxid vagy titán-oxid réteggel. Minden felületen legalább három mérést végeztünk két különböző csipet használva. A mérések után a felületet 0.1 M HCl oldatban ultrahanggal 10 percig, majd oxigén plazmával 2 percig tisztítottuk. A kísérletek szerint a PLL-*g*-PEG gyorsan és irreverzibilisen kötődik a vizsgált felületekre. A különböző oxidokon kicsit különbözött az adszorbeálódott PLL-*g*-PEG mennyisége. Ezt mutatja a 17. ábra a felületek izoelektromos pontjának függvényében.



17. ábra: A PLL-g-PEG adszorpció izoelektromos ponttól való függése

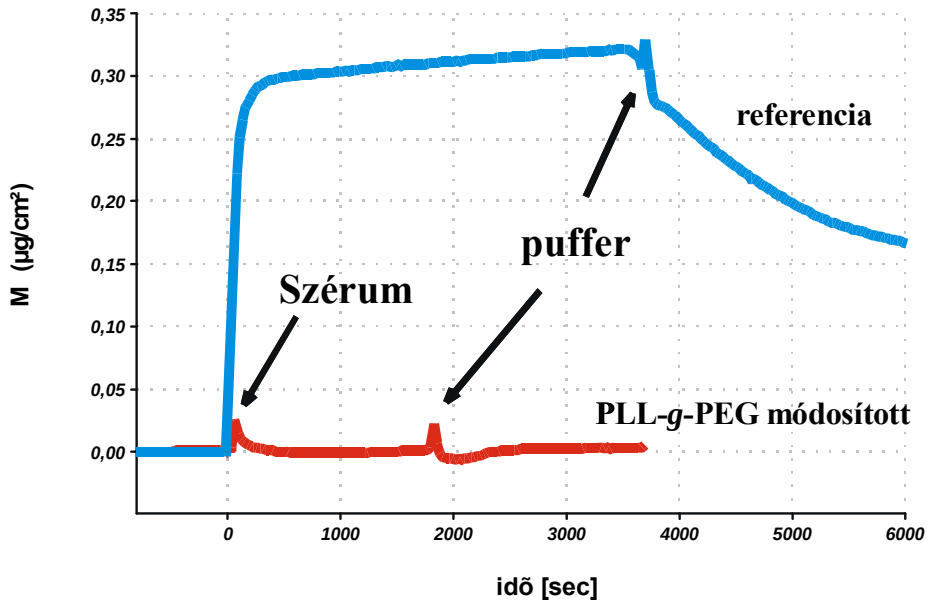
Látszik, hogy minél kevesebb a negatív töltés a felületen, annál kevesebb PLL-g-PEG kötődik rá. A mérési görbék kiértékelésekor a szokásos Langmuir vagy RSA kinetika helyett a 18. ábrán látható görbéket kaptunk. A koncentráció változtatásával a kezdeti szakaszban mutatkozó plató hossza változott, ami arra utalt, hogy a mérés az adszorpció gyorsasága miatt diffúzió függő. Ennek igazolására modellt készítettünk, ahol a paraméterek megfelelő választásával hasonló dM/dt vs. M görbéket kaptunk. A paraméterek illesztését a kísérletek szórása miatt nem tudtuk elvégezni. A szórás lecsökkentésének érdekében új küvettát terveztünk, ahol a küvetta hidrodinamikája miatt egyszerűbb és reprodukálhatóbb kinetikát várunk.



18. ábra: A PLL-g-PEG adszorpció kinetikája

3.3.3.2 Fehérjeadszorpciós kísérletek

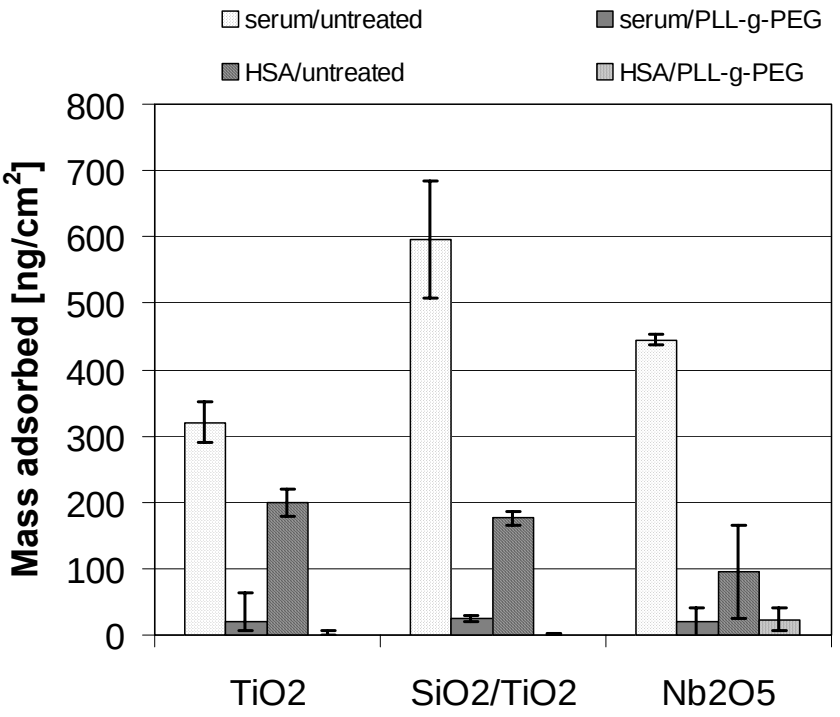
Többféle fehérje illetve szérum adszorpcióját vizsgáltuk PLL-*g*-PEG-al bevont felületeken. A kísérletek menete a következő volt: Mindig HEPES Z1 puffert használtunk. A legalább egy napig pufferben tartott hullámvezetőt a BIOS-1 műszerbe helyeztük és küvettával rögzítettük. Ezeknél a kísérleteknél álló folyadékban mértünk, az anyagok cseréjét pedig nagy mennyiségű (0.5 ml) anyag küvettán keresztül történő gyors injektálásával végeztük. A pufferben általában a mérés kezdete után 30 perccel már stabil alapvonalat kaptunk, ezután 0.1 mg/ml PLL-g-PEG oldatot, majd 30 perc elteltével puffert injektáltunk a küvettán keresztül. Így követni tudtuk a PLL-*g*-PEG réteg kialakulását a felszínen. Ezután a fehérje illetve szérum következett, amit egy órán keresztül mértünk, majd végül ismét puffer injektálással öblítettük a rendszert, és újabb fél órán keresztül néztük az esetleges deszorpciót. Egy ilyen mérésre mutat példát a 19. ábra.



19. ábra: Fehérjeadszorpciós mérés PLL-g-PEG felületen

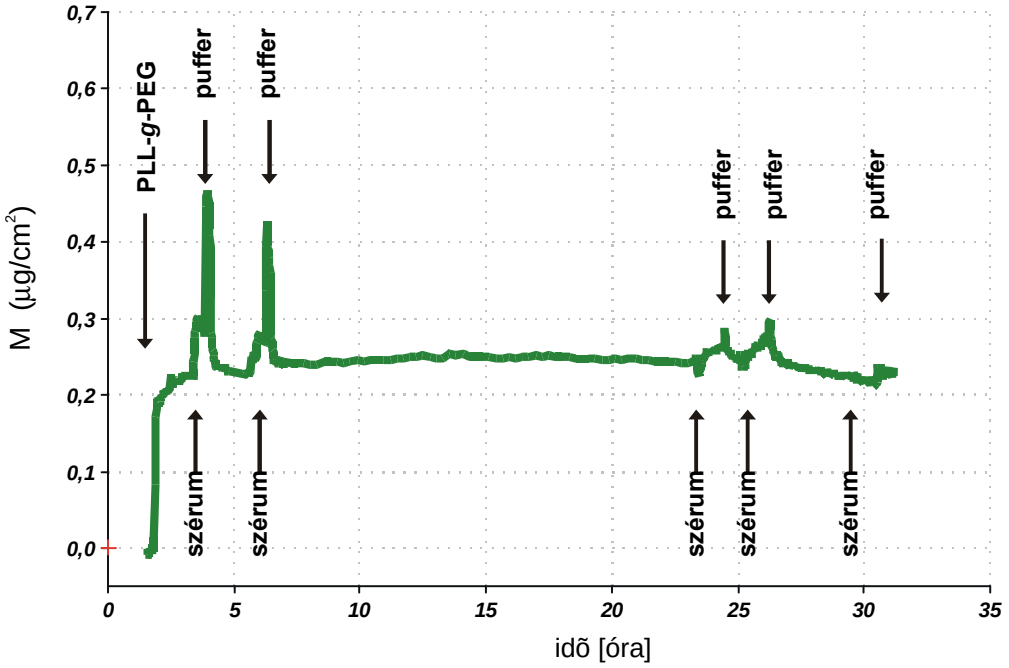
A referencia mérések során a méréseket a PLL-*g*-PEG adszorpciós szakasz elhagyásával ugyanígy végeztük. Humán szérum és 1mg/ml humán szérum albumin (Roche, Svájc) adszorpcióját teszteltük. Minden felületet minden fehérjével legalább háromszor mérve a 20. ábrán látható eredményeket kaptuk. Nyilvánvaló, hogy a PLL-g-

PEG réteg nagy mértékben csökkentette a fehérjék adszorpcióját mindegyik felületen.



20. ábra: A PLL-g-PEG réteg fehérjeadszorpciót csökkentő hatása

A kapott értékek mindkét esetben legalább tízszer kisebbek a referencia felületeknél, helyenként pedig olyan kicsik, hogy a mérések egy részénél a 1ng/cm^2-es érzékenységi határ alatt maradtak. Ez különösen a szérum esetében kiugróan jó fehérjerezisztens tulajdonságnak számít. Mivel a szérum igen összetett – a fehérjéken kívül lipidek, vitaminok, aminosavak, és sók is találhatók benne –, ezért azt is megállapíthatjuk, hogy ezek az anyagok sem kötődnek a PLL-*g*-PEG felszínre. Azt is teszteltük, hogy többszöri mérés során mennyire stabil a PLL-*g*-PEG réteg, illetve hogy mennyire őrzi meg a jó fehérjerezisztens tulajdonságát. A 21. ábrán látható, hogy több szérum-adszorpciós ciklus után sincs jelentős fehérjemennyiség a felszínen, illetve, hogy maga a réteg sem változik a kísérlet ideje alatt.

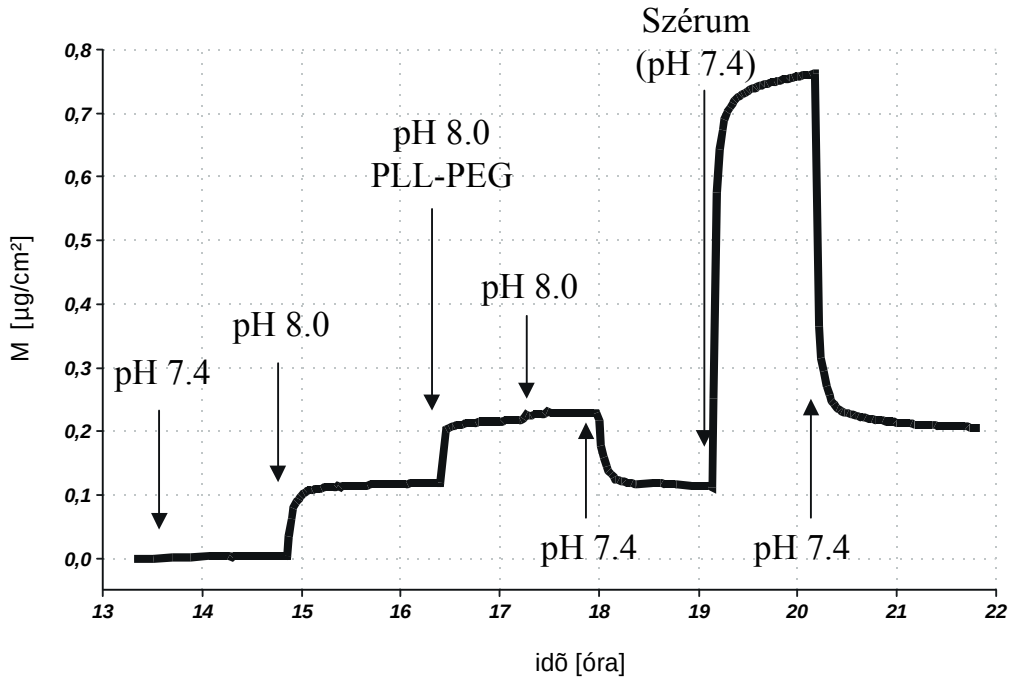


21. ábra: A PLL-g-PEG réteg stabilitásvizsgálata ismételt szérum adszorpcióval

A leghosszabb ilyen kísérlet, amit végeztünk 5 napig tartott, de a 30 napig pufferben tárolt PLL-g-PEG -el bevont szenzorok is hasonlóan jó fehérjerezisztens tulajdonságot mutattak.

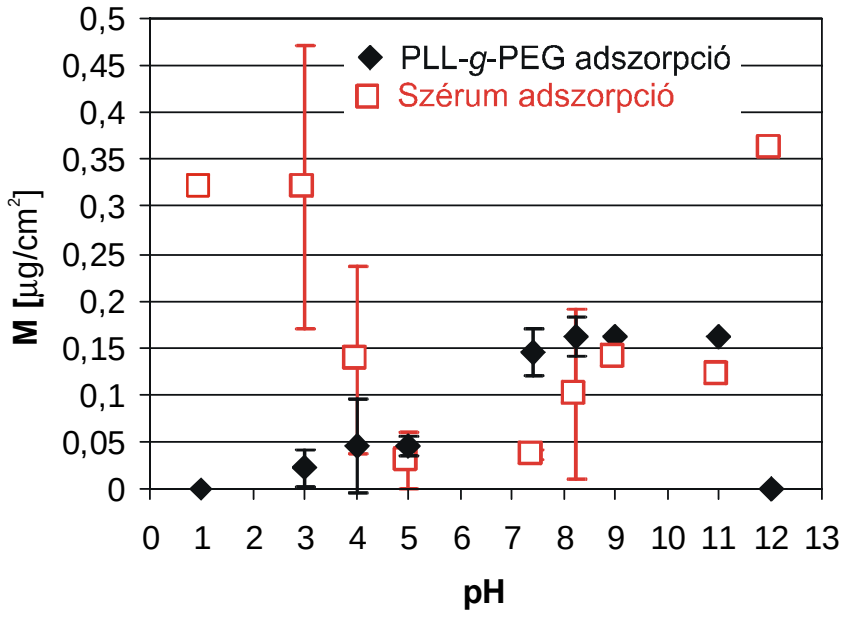
3.3.3.3 A PLL-g-PEG adszorpció pH függésének vizsgálata

A PLL-g-PEG rétegeken a karakterizálás során elvégzett mérések vákuumtechnikai módszerrel történtek. Bár alátámasztani látszottak azt a hipotézisünket, hogy a PLL gerinc pozitív töltése miatt kötődik a negatívan töltött fém-oxidok felületére, szerettük volna ezt vizes közegben is igazolni. Ennek érdekében az OWLS -t használva különböző pH-kon megmértük a PLL-*g*-PEG adszorpciót. Utána a kapott bevonatokat 7.4-es pH-n teszteltük humán szérummal, hogy lássuk mennyire fehérjerezisztens. A mérésekhez mindig ASI 2400µV $Si_{0.4}Ti_{0.6}O_2$ hullámvezetőket használtunk. A kísérletek pontos menete pedig a következő volt (egy ilyen mérést mutat a 22. ábra):



22. ábra: Tipikus kísérlet a PLL-*g*-PEG adszorpció pH függésének vizsgálatára

Titrálással különböző pH-jú 10 mM-os HEPES puffert készítettünk. A mérések első részét, a PLL-*g*-PEG adszorpciót, ebben végeztük. A 0.1 mg/ml PLL-*g*-PEG is mindig ebben az adott pH-jú pufferben volt feloldva. Az adszorpciós idő 60 perc, az utána következő öblítés 30 perc volt. Ezután a 7.4 pH-jú HEPES Z1 pufferre váltottunk és ebben végeztük el a kísérlet fehérjeadszorpciós részét. Itt is a 60 perces szérum kezelést 30 perces öblítés követte. A kapott eredményeket összegzi a 23. ábra. Jól látható, hogy a várakozásoknak megfelelően a magas, illetve alacsony pH-kon a PLL-g-PEG adszorpció lecsökken. Ennek természetes következményeként ugyanakkor megnövekedett szérum adszorpciót tapasztalunk ezeken a rétegeken. A polimer és a felszín izoelektromos pontja közötti pH tartományban viszont a réteg kielégítő fehérjerezisztens tulajdonsággal rendelkezik. Ez alátámasztja a kötődés ionos jellegét.



23. ábra: A PEG-*g*-PLL adszorpció pH függése és az azt követő szérum adszorpció TiO_2 felületen

3.3.4 A fejezet összefoglalása

Ebben a fejezetben kétféle stratégiát láthattunk a felületi fehérje adszorpció lecsökkentésére. A poliuretán alapú műanyagok könnyen formázhatóak és ismert biokompatibilitásuk miatt használatuk széles körben elterjedt. Az itt bemutatott foszforilkolin tartalmú polimerek fehérjerezisztens tulajdonságuk miatt egy továbblépést jelentenek a hemokompatibilis alkalmazások területén. Az pedig, hogy vékony rétegként alkalmaztuk az OWLS szenzorokra jelentős előrelépés az ilyen polimerek fehérjeadszorpciós tulajdonságainak kvantitatív méréséhez. Ezzel egyúttal az első példa az irodalomban az OWLS technika polimerek adszorpciós tulajdonságainak tesztelésére való alkalmazására.

A második részben pedig a PLL-PEG polimerrel foglalkoztunk. A fém oxidra való kötődési mechanizmusa szép példa polielektrolitok töltött felületekre való kötődésére. A polimer gyorsan, tíz percen belül stabil réteget képez a felületen, ami egyedülálló fehérjerezisztens tulajdonsággal rendelkezik. Ez azt is lehetővé tette számunkra, hogy nem csak egyes fehérjék, hanem szérum adszorpcióját is vizsgáljuk, amire nem sok példa van az irodalomban. Ezért ezt az alkalmazást is szabadalmaztattuk.

4 SEJTEK ÉS FELÜLETEK KÖLCSÖNHATÁSA

4.1 Sejtek mérése OWLS-al

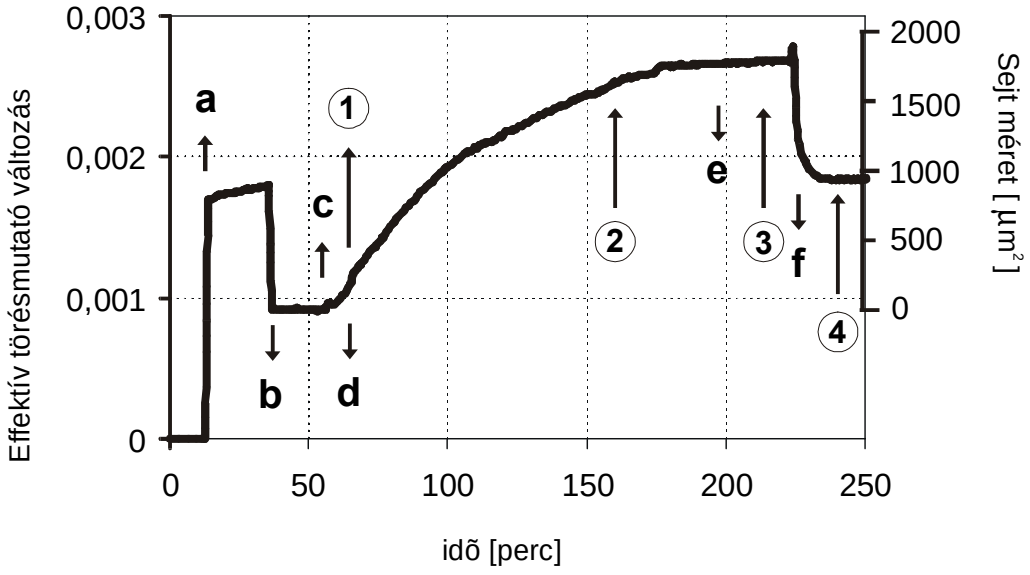
Az OWLS technika egy olyan módszer, amit eddig főleg nanoméretű biomolekulák adszorpciójának vizsgálatára alkalmaztak. A sejtek felületekhez tapadásakor lejátszódó folyamatok egyre nagyobb fontossággal bírnak a biokompatibilis anyagkutatásban. A fokális és közeli érintkezések kimutatásakor a mikroszkópok felbontási határukhoz érkeztek. Szükség van olyan módszerekre, amik segítenek ezen túllépve, a kötési folyamatokban fontos fehérjéket is figyelembe venni. Az aktiváló fehérjék fontossága régóta ismert az irodalomban. A sejteket felülethez kötő szerepük jobb megértéséhez nyújthat segítséget az OWLS technika, kiváltva más indirekt, idő és költségigényes sejtkultúrás kísérleteket. Az első sejtekkel történt OWLS mérések nyomain haladva [45] nekünk sikerült stabil, könnyen kezelhető és reprodukálható méréseket végeznünk. Erre a tapasztalatra alapozva pedig egy újfajta cito-toxikológiai alkalmazást tudtunk kidolgozni. Ez azért fontos, mert a modern vegyi- és gyógyszeripar nagy számban termel ki új vegyületeket, amiknek mezőgazdasági, vagy gyógyászati alkalmazásához, a mellékhatások teszteléséhez toxicitás vizsgálatokra van szükség. Ezeket általában állatokon végzik, ami sok időt vesz igénybe, és nagyon költséges. Ezeknek a kísérleteknek a lerövidítéséhez járulhat hozzá egy olyan gyors és olcsó cito-toxikológiai vizsgálat, mint amilyet a fejezet második részében bemutatunk.

Az irodalomban már sokfajta sejteket használó bioszenzorról olvashatunk. Ezek közül a legtöbb a sejten belüli enzimatikus aktivitást használja fel, hogy egy közvetítő molekula révén optikai vagy elektromos jelet kapjon [46,47,48,49,50]. Ilyen bioszenzorokat használnak már pl. szennyvíz analizálás és egyéb környezetvédelmi célokra [51]. Ezeken kívül léteznek idegsejteket használó szenzorok, amikkel különböző neurotoxikus anyagok detektálását végzik [52,53].

A sejtek morfológiájának, a felülettel való kölcsönhatásának nyomon követésével lehetőség van a funkciókban bekövetkező esetleges változások felismerésére. Újabban többfajta próbálkozás született a sejt és a felületek közvetlen tanulmányozására. A sejtek kapcsolódását és szétterülését kimutatták például kvarc kristály mikromérleggel (QCM) [54,55]. A teljes belső reflexió (TIR) módszere is hasznos eszköznek bizonyult a sejtek és a felület kapcsolódásának vizsgálatához [45,56,57].

4.1.1 A mérés menete

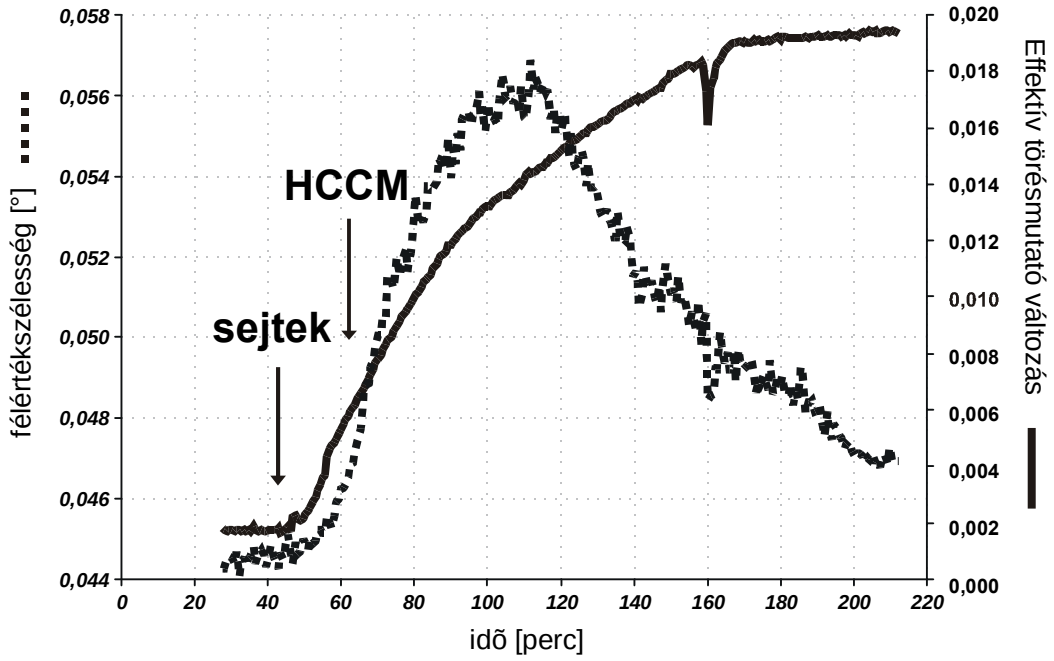
A kísérletek során mindig MC-3T3 E1 egér oszteoblaszt sejtvonalból származó sejteket [58,59] (Patho-fiziológiai Tanszék, University of Bern, Svájc), szubsztrátként pedig 20 nm TiO_2-al bevont ASI 2400 μV hullámvezető szenzorokat [60] használtunk. Itt is a csipeket a mérések megkezdése előtt legalább 24 órát HEPES Z1 pufferben áztattuk, így a BIOS-1 műszerbe helyezés után 30 percen belül stabil alapvonalat kaptunk. Ezután 30 percig 100%-os FBS -al inkubáltuk a felületet, és közben nyomon követtük a fehérjeadszorpciót. Ezután 5% FBS-t tartalmazó HEPES pufferolt sejt kultúra tápoldatra (HCCM) váltottunk, amire azért volt szükség, mert a normál – CO_2 pufferolást használó - tápoldatokkal gondot okozott, hogy a sejtek CO_2 termelése miatt a pH változott a küvettában, ami az OWLS mérés során gondot jelentett [61]. Mivel a felület már gyakorlatilag fehérjékkel telített, ezért 10 perc alatt stabil rendszert kaptunk. Ezután HCCM-ben levő sejteket fecskendeztünk be a küvettába 400,000/ml koncentrációban. Vártunk 5 percet, míg a sejtek leültek a felszínre, majd HCCM-re váltottunk, amit 1 ml/h sebességgel folyattunk a rendszeren keresztül, hogy a sejteket folyamatosan friss tápoldattal lássuk el. A 400,000/ml koncentráció egy teljes sejtréteg kialakulásához volt elég, ami általában 100-120 percig tartott. (24. ábra)



24. ábra: Tipikus OWLS sejtmérés: **a/** HEPES Z1, **b/** FBS, **c/** HCCM, **d/** oszteoblaszt sejtek, **e/** HCCM (1 ml/h), **f/** toxikus anyag.

4.1.2 A csúcsok félértékszélesség változása

A sejtek szétterülése során az OWLS csúcsok félértékszélessége érdekes változáson megy keresztül (25. ábra). A sejtek méretük miatt optikai szempontból egy felületi inhomogenitást képviselnek. Ahogy egyre nagyobb részt foglalnak el a hullámvezető felszínétől számított 200 nm-es sávban, a hullámtérben, ahol a rendszer érzékeny, egy darabig a csúcsok félértékszélessége nő. Az 50%-os lefedettség után azonban a felület megint egyre homogénebb lesz, mert egyre nagyobb helyet fednek le a sejtek, így a félértékszélesség ismét csökken. Ezért a félértékszélesség mérésével egy alternatív módot találtunk arra, hogy a felület lefedettségét mérjük. Ez az első eset, hogy az OWLS technika alkalmazása során nem csak a csúcsok helyének változásából, hanem azok alakjából is információt nyerünk ki.



25. ábra: A TM csúcs félértékszélességének változása a sejtek szétterülése során

A jelenség részletes leírását, elméleti megalapozását és más alkalmazásokra való kiterjesztését tartalmazó publikáción Dr. Papp Elemérrel és Horváth Róberttel jelenleg is dolgozunk.

4.2 Toxikológiai mérések

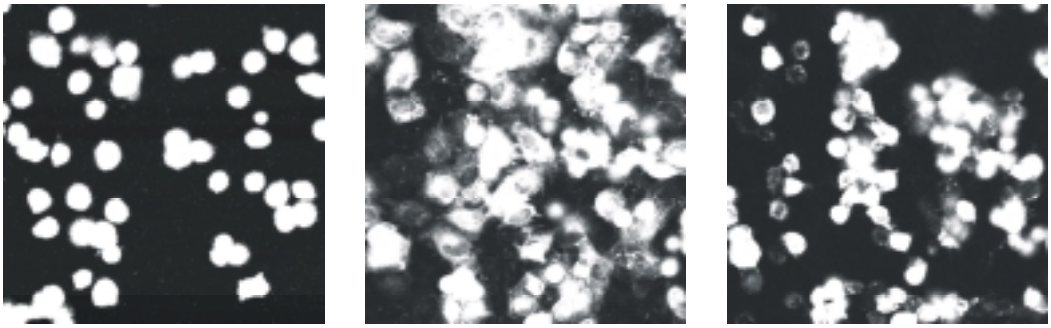
Az előzőekben példát láthattunk arra, hogy hogyan tudjuk az OWLS segítségével a sejtek szétterülésének kinetikáját nyomon követni. A sejtek alakja és funkciója szoros

összefüggést mutatnak. Ezt próbáltuk meg kihasználni a tápoldatban jelenlevő toxikus anyagok kimutatására. Az OWLS technika lehetővé teszi, hogy nagy pontossággal megállapítsuk, hogy mekkora felületen érintkeznek a sejtek a hullámvezetővel. Ennek a technikának az előnye a nagy pontosság és a nagy felületi érzékenység, hátránya, hogy nem vizuális, és csak a szenzor felszínének 200 nm-es környezetében érzékeny. A CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) technika egy sejt alakjáról nyújt 3 dimenzióssá alakítható vizuális információt. Hátránya, hogy kevésbé pontos, illetve, hogy fluoresszens jelölés alkalmazásával működik. Ezt a két technikát kombinálva, a sejtek morfológiai változásait pontosan mérve egy nagy érzékenységű toxikológiai szenzort kaptunk.

4.2.1 Az OWLS mérések kalibrálása a CLSM képek segítségével

Az OWLS technika elméletéből következik, hogy míg a felületre merőleges irányban nm-es felbontással rendelkezik, addig a felülettel párhuzamosan gyakorlatilag a lézer által megvilágított 1 mm^2-es felület átlagát méri. Nagyon fontos volt tehát, hogy a CLSM képek segítségével vizuális információval is rendelkezzünk arról, hogy mi zajlik a felületen. Ennek érdekében, Roman Graf kollégámmal közösen, teljesen egyforma küvettákat használva párhuzamos OWLS és CLSM méréseket végeztünk úgy, hogy mindent műveletet egyszerre és egyformán hajtottunk végre. Egy ilyen mérésre példa a 24. ábra, ahol bejelöltük a párhuzamosan végzett CLSM mérésből származó felvételek készítésének időpontjait. Ebben az esetben az OWLS mérés során is DiIC18(3) (1,1'-dioktadekil-3,3,3',3'-tetrametil-indokarbocianin perklorát [62,63], Molecular Probes, USA) fluoresszens jelölővel megjelölt sejteket használtunk. A különböző időpontokhoz tartozó képek kvalitatíven jól követik az OWLS görbét (26. ábra).

Ezeken a felvételeken „analysis“ képanalizáló szoftver segítségével megállapítottuk a sejtek sűrűségét, és átlagos méretét. A maximális 91%-os lefedettséget, és a megállapított sejtsűrűséget felhasználva kalibrálni tudtuk az OWLS méréseket is.



1 **3** **4**

26. ábra: A párhuzamos OWLS-CLSM mérés során a 24. ábrán számokkal jelölt időpontokban készített CLSM képek (Roman Graf disszertációjából)

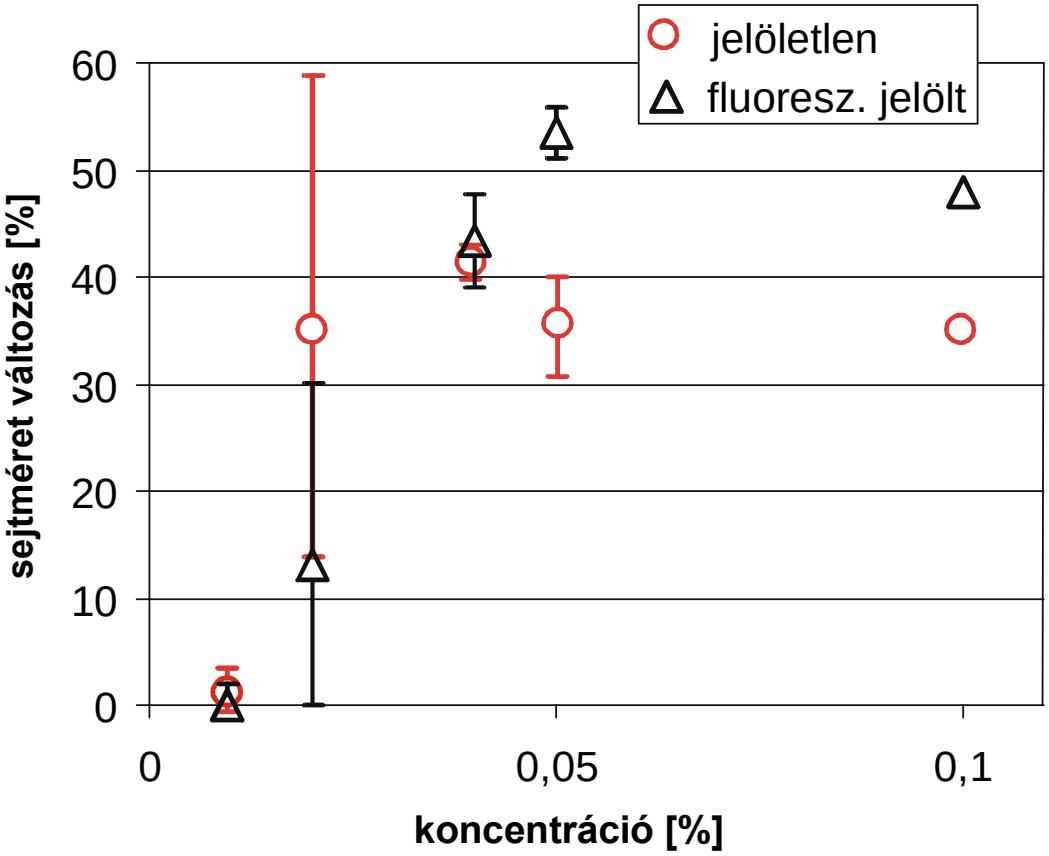
Az így kapott átlagos sejtméretet újra összehasonlítottuk a többi CLSM felvétellel, így kaptuk a 4.1. táblázatot. Látható, hogy az adatok elég jó egyezést mutatnak.

4.1. táblázat: CLSM és OWLS technikával mért átlagos sejtméretek

idő [perc]	OWLS [μm^2]	CLSM [μm^2]
4	360	440
104	1600	1200
170	1800	1800
180	1100	1120

4.2.2 Kritikus toxin koncentráció meghatározása

A 24. ábra utolsó szakasza a modell toxikus anyagnak választott nátrium-hipoklorid (NaOCl) hatását mutatja a sejtekre. (A görbén látható ugrás nagyságáról érdemes megjegyezni, hogy nagyobb, mint a mérési pontosság kétszázszorosa.) Ez esetben a sejtek a kis mennyiségben jelenlévő toxikus anyagra összehúzódással válaszolnak. Több ilyen mérést végezve különböző koncentrációjú NaOCl-t használva megállapíthatjuk a kritikus koncentrációt, aminél nagyobb koncentrációkra a rendszer reagál (27. ábra). Ezen az ábrán külön feltüntettük a fluoreszcensen megjelölt sejtekkel végzett méréseket is. Ebben az esetben a jelölésnek nem volt számottevő hatása a toxikus válaszra.



27. ábra: A sejtek méretváltozásának NaOCl koncentrációtól való függése

A koncentrációfüggés érdekesen alakul: 0.02% -os NaOCl tartalom alatt gyakorlatilag nem kapunk morfológiai elváltozást, de ezt a kritikus értéket meghaladó koncentrációkra a sejtek erős összehúzódással válaszolnak. (Érdemes megemlíteni, hogy ennek az értéknek a 250-szeresét használják fertőtlenítésre.)

A NaOCl-t csak modell toxikus anyagként használtuk a technika érzékenységének kipróbálására. A másfajta mérgező anyagokkal, illetve hormonra érzékeny sejtekkel történő mérések már folyamatban vannak. Ezek során már nem csak a kialakult sejtréteg morfológiai változásait vizsgáljuk, hanem megpróbáljuk a szétterülés kinetikájának toxikus anyagtól való függését is kimutatni. A sejtekkel való toxikológiai mérést szenzortechnológiai újszerűsége és fontossága miatt szabadalmaztattuk [64].

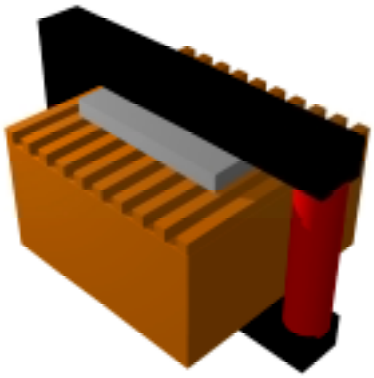
5 MINTÁZAT A HULLÁMVEZETŐ FELÜLETÉN

5.1 Mintázatok készítése és karakterizálása

A modern biológiai szenzortechnológiában a fejlődés és kutatás egyik fő iránya, hogy hogyan lehetne a már létező mérési eljárásokat felgyorsítani és a szenzorokat olcsóbbá tenni. Ennek érdekében a mikroelektronikához hasonlóan egyre inkább előtérbe kerül a miniatürizálás fontossága. A szenzorokat minél több, jellemzően 1-100 μm karakterisztikus méretű elkülönülő részre felosztva megnövelhető a műszerek hatásfoka. Ilyen mintázatok segítségével lehetőség nyílt olyan szenzorok készítésére, amelyeken egy időben több mintát lehet mérni, vagy egy mintán egyszerre többféle mérést lehet elvégezni. A mintázatok készítésére az utóbbi időben egyre gyakrabban használják a mikrokontakt nyomtatást (microcontact printing), vagy a mikrocsatornákat (microfluidic networks) [65]. Mi ez utóbbit használtuk a 3.3 fejezetben már ismertetett fehérjerezisztens polimer, a PLL-*g*-PEG mintázatok elkészítésére. Az ebben a fejezetben szereplő méréseket Reto Kesslerrel és Dr. Gregory Kenausis-szal közösen végeztük.

5.1.1 Mintázatkészítés a mikrocsatornák segítségével

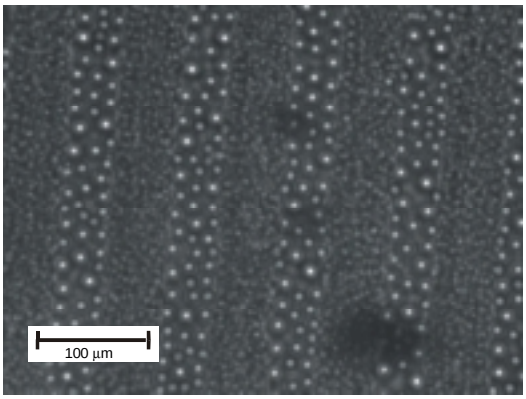
A mikrocsatornák segítségével a 28. ábrán látható módon gyorsan és egyszerűen lehet PLL-*g*-PEG mintázatokat készíteni. A polidimetoxiszilán (PDMS) mikrocsatornákat fotolitográfiás úton készült mestermaszkra öntéssel állítottuk elő.



28. ábra: PLL-g-PEG mintázat készítés TiO_2 felületen mikrocsatornák segítségével (Reto Kessler diplomamunkájából)

A PDMS mikrocsatornákat a modell szubsztrátnak választott TiO_2-al bevont ASI 2400μV hullámvezetőkre rögzítettük a 28. ábrán látható szorító segítségével. A PDMS tömb szabadon maradó részére helyezett 0.1 mg/ml töménységű PLL-*g*-PEG oldat a kapilláris erőknek köszönhetően behatolt a csatornákba, és tíz perc alatt jól definiált mintázatot hozott létre.

Ez látható a HEPES Z1 pufferrel öblítés és nitrogénnel szárítás után készült, mikrocseppek kondenzációját mutató képen (29. ábra).

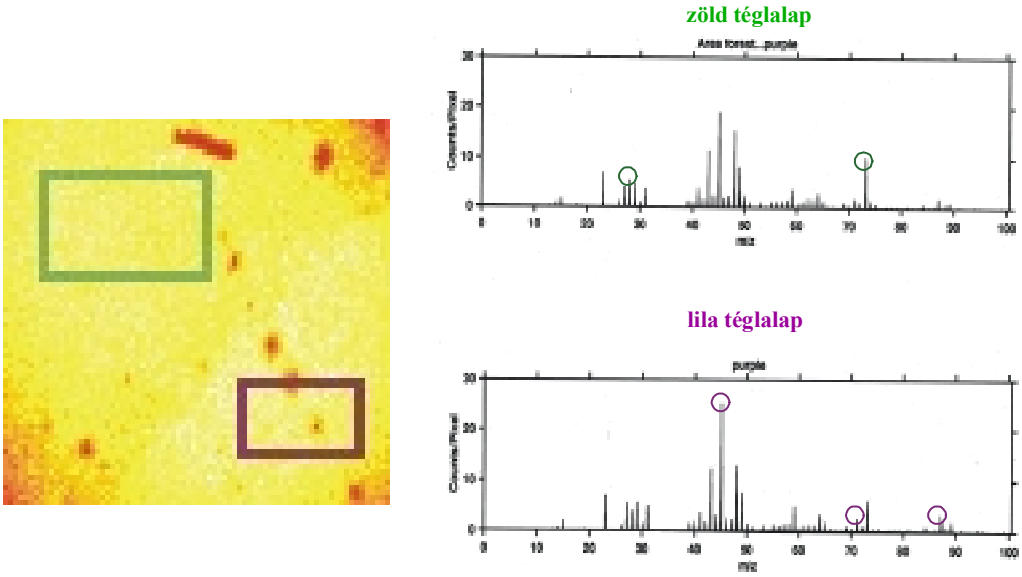


29. ábra: Kondenzációs vízcseppek a PLL-*g*-PEG mintázaton (a csatorna-méret 40 µm)

Sajnos nagyon hasonló képet kaptunk akkor is, ha a PLL-*g*-PEG oldat helyett desztillált vízzel csináltuk a "mintázatkészítést". Ez, és a PDMS - szel érintkezett felületeken mért 80°±2°-os nedvesítési szög arra engedett következtetni, hogy a maszkolás során valami szennyezés kerül a felszínre. (A tiszta TiO_2 nedvesítési szöge 10°±1°, a PLL-*g*-PEG felületé pedig 40°±2°.)

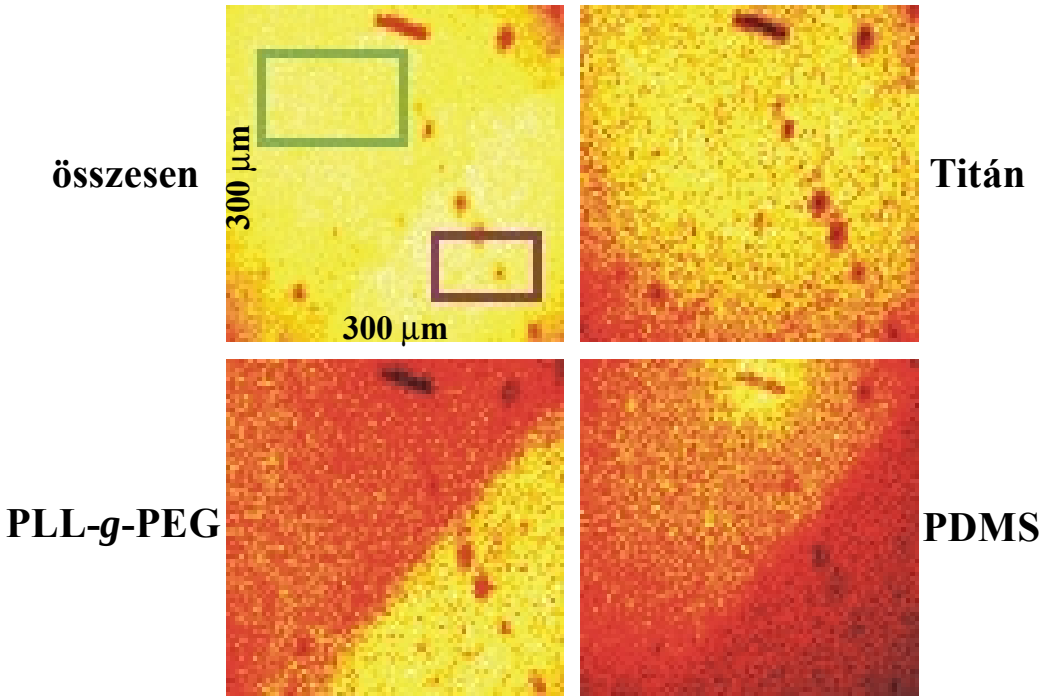
5.1.2 I-ToFSIMS mérések

A pásztázó ToFSIMS méréseken szintén látható a felszínen lévő mintázat (30. ábra).



30. ábra: I-ToFSIMS kép a PLL-g-PEG mintázaton (a teljes spektrum)

A mérést egy olyan mintán végeztük, aminél 450 μm PLL-*g*-PEG csíkok között 550 μm volt a kimaszkolt rész. Ha csak a PLL-*g*-PEG -re, vagy az ismert PDMS-re jellemző csúcsokat ábrázoljuk a határvonal még élesebben kirajzolódik. A világosabb színek a nagyobb intenzitást jelölik, ezért az is látszik, hogy a kimaszkolt részeken lévő PDMS szennyeződés váltakozik a PLL-*g*-PEG csíkokkal. (31. ábra)



31. ábra: I-ToFSIMS kép a PLL-g-PEG mintázaton, a világos színek felelnek meg a nagyobb intenzitású helyeknek

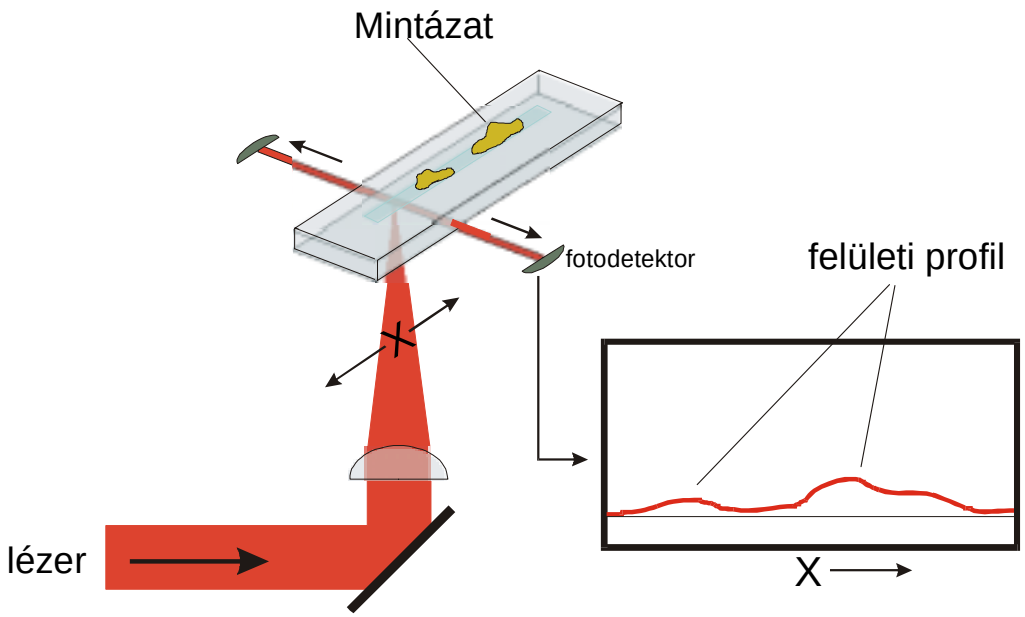
Ezek szerint a mintázatkészítés során fél sikert értünk el: sikerült a PLL-*g*-PEG -et a kívánt helyre juttatni, de közben a maszkkal érintkezésbe került részeken PDMS szennyeződést találtunk.

5.2 OWLS mérések mintázott felületeken

Dr. Roger Kurrat doktori disszertációjában [66] található meg annak a mérési technikának a részletes leírása, ami lehetővé teszi az OWLS technika alkalmazását mintázott felületeken, és aminek kifejlesztésében én is részt vettem.

5.2.1 A mérőműszer továbbfejlesztése

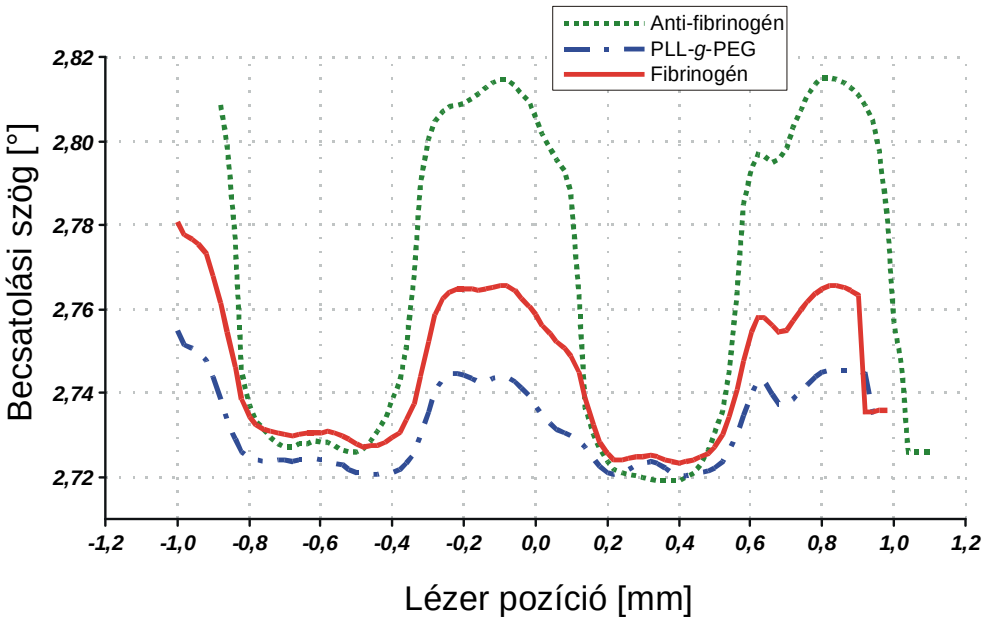
Annak érdekében, hogy minél kisebb mintázatokon tudjunk mérni, először szükség volt az érzékeny felület lecsökkentésére. Ezt a lézerfolt cilindrikus lencsével 1mm×0.1mm -es ellipszoiddá történő fókuszálásával lehetett megoldani (32. ábra). Ugyanakkor egy plánparallel üveglemez forgatásával lehetőség nyílt a lézerfolt ráccsal párhuzamos irányban történő mozgatására.



32. ábra: A pásztázó OWLS műszer vázlata

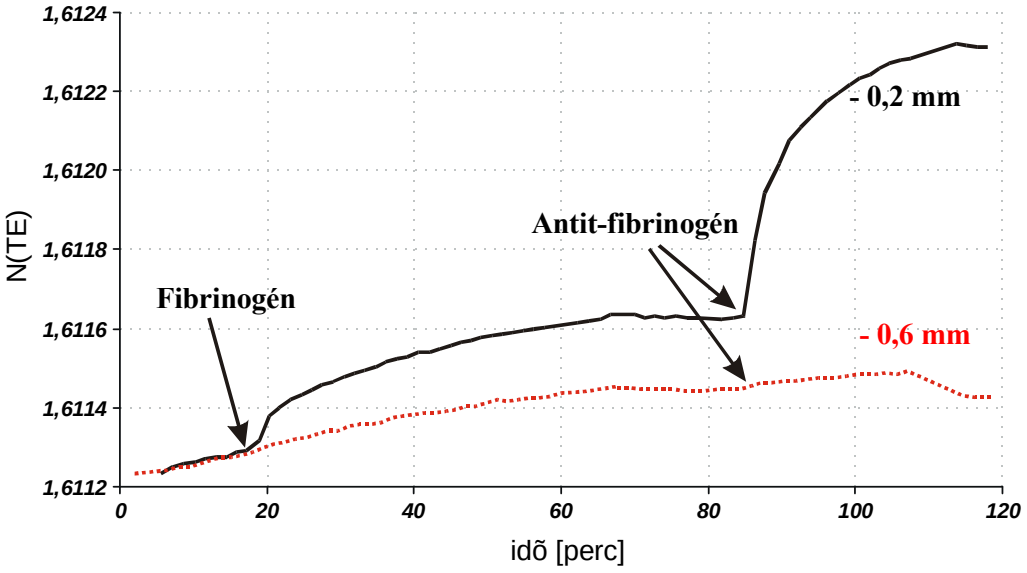
Ennek a két változtatásnak köszönhetően a hullámvezetőkön két újfajta mérést tudtunk végezni:

- Egy egyensúlyi állapotban lévő szenzor felületét a ráccsal párhuzamos irányban le tudtuk tapogatni úgy, hogy egy 1mm×0.1mm -es ablakkal 5μm pontossággal lépegettünk mintegy 2mm-es szakaszon. Ez természetesen elég gyenge felbontást ad a felülettel párhuzamosan, de mivel a merőleges irányban adott az OWLS technika rendkívüli felbontóképessége, ezért ez az új módszer egyedülálló mérésekre ad lehetőséget. A 33. ábrán fehérje monoréteg csíkokat láthatunk.



33. ábra: Fibrinogén és antifibrinogén csíkok a PLL-g-PEG -gel mintázott szenzoron

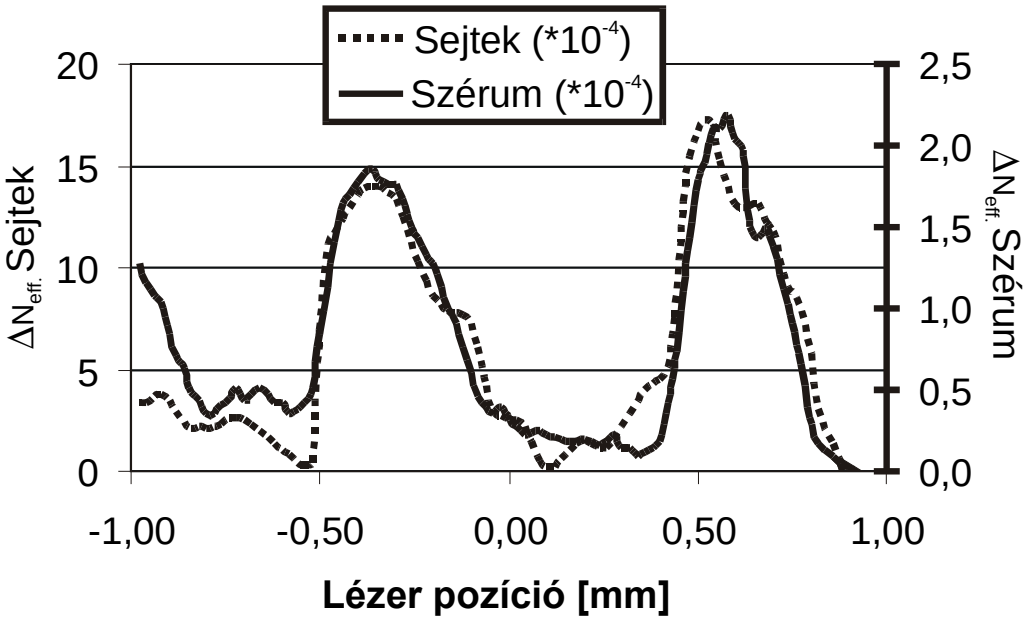
- A szenzor közepén levő 2mm -es szakasz elvileg tetszőleges, gyakorlatilag maximum 10-20 pontját kiválasztva ezeken kvázipárhuzamosan tudunk felületi adszorpció kinetikát mérni. (A "kvázipárhuzamos" arra utal, hogy a kiválasztott pontokon egymás után végrehajtunk egy csúcsmérést, majd kezdjük elölről. Ez azt jelenti, hogy az időbeli felbontás a csúcsok számának növelésével romlik.) Ennek jelentősége, hogy mintázott felületeket használva többféle felszínt tudunk egyszerre, ugyanabban a küvettában, gyakorlatilag ugyanolyan körülmények között tesztelni. A PLL-*g*-PEG felületet pedig fehérjerezisztens tulajdonsága miatt kiváló referenciafelületként lehet alkalmazni (34. ábra).



34. ábra: Párhuzamos mérés a PLL-g-PEG -gel mintázott szenzoron. A szenzor közepétől 0.6 mm-el eltávolodva azt tapasztaljuk, hogy nincs fehérjeadszorpció, és a mérési görbén csak a drift látszik, míg a 0.2mm-nél mérten jól látható a fehérjék adszorpciója.

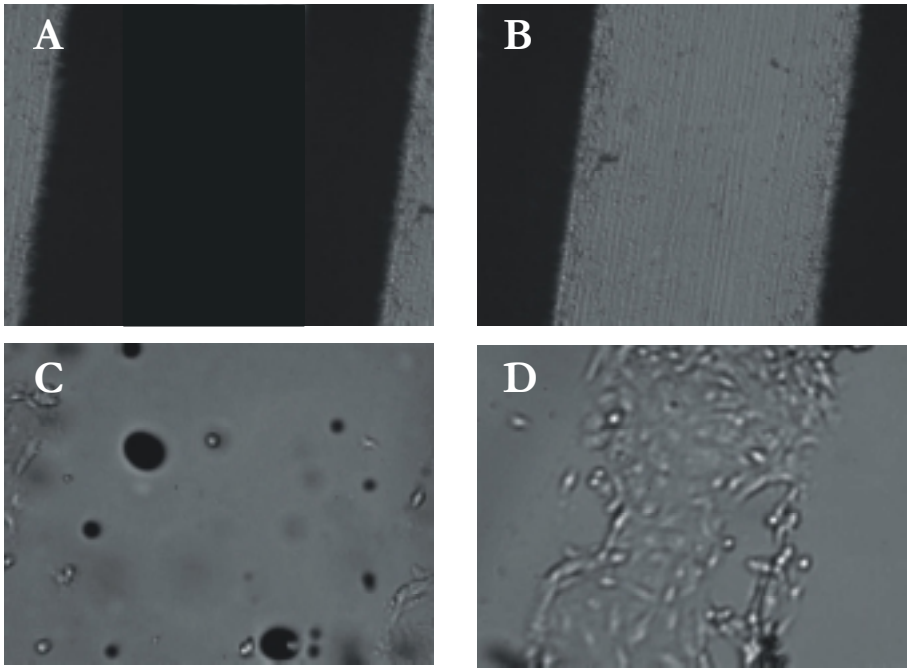
5.2.2 Pásztázó mérések sejtmintázatokon

Felhasználva a fehérjerezisztens polimerekről és a sejtes mérésekből tanultakat, az ismertetett mintázat készítő eljárás segítségével sikerült sejtmintázatokat előállítanunk. Ehhez először a mikrocsatornás eljárással PLL-*g*-PEG -el bevont csíkokat készítettünk egy 10 nm vastag TiO_2 felületű ASI 2400μV hullámvezetőre, majd végrehajtottunk egy a 24. ábrán látható standard sejtes mérést. A kísérlet során háromszor: az elején a HEPES Z1 pufferban, a szérum adszorpció után, és végül a sejtek szétterülése után - kihasználva a módosított OWLS által nyújtott új pásztázási lehetőséget - elkészítettük a felület profilját (35. ábra)



35. ábra: Fehérjeadszopció és sejtkapcsolódás a PLL-*g*-PEG -gel mintázott szenzoron

A használt mikrocsatornák szélessége 550 μm, a köztük lévő blokkolt részé pedig 450 μm volt. Ezek a karakterisztikus méretek jelennek meg a fehérjeadszorpciót ábrázoló görbén, és az azt követő sejtkapcsolódáskor is. (Vegyük észre, hogy a sejtek méretüknél fogva sokkal nagyobb effektív törésmutató változást okoznak, mint a fehérjék.) Az ugyanerről a szenzorról mikroszkóppal készült képen jól látszanak a szétterült sejtekből álló csíkok (36. ábra), amik jól megfeleltethetők a PDMS mikrocsatornák méreteinek.



36. ábra:

A) Egy 550 μm széles PDMS mikrocsatorna

B) Egy 450 μm széles, a csatornákat elválasztó barázda, ami a mintázatkészítéskor érintkezik a felülettel

C) A PLL-*g*-PEG –vel bevont felszínen nem figyelhető meg sejtadhézió

D) Szétterült oszteoblaszt sejtek a mintázott TiO_2 felület blokkolt (nem bevont részén)

Sikerült tehát elérnünk, hogy a sejtek a hullámvezető felületén elkülönülő sejtcsoportokat hozzanak létre. Ezeket egyszerre, de külön-külön tudjuk a módosított OWLS technikával mérni. Ezáltal lehetőségünk van a toxikológiai módszerünk statisztikai vizsgálatára, illetve mikroküvetták használatával egyidőben több minta mérésére.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat elsősorban a szakterületemhez: az integrált optikai szenzorokhoz és azok bioanyagkutatásban történő alkalmazásaival foglalkozik. Az 1. fejezet tartalmazza a szenzor működésének megértéséhez szükséges rövid elméleti áttekintést és a számolásokhoz használt fontosabb egyenleteket.

Ezt követi a témához nem szorosan kapcsolódó, de újszerűsége és alkalmazhatósága miatt mégis ide tartozó nyomásmérésről szóló 2. fejezet. Egy „kis“ zavaró jelenség vizsgálatára tervezett, illetve a Dr. Csúcs Gábor által elvégzett mérések adataira támaszkodva sikerült olyan modellt készítenem, ami nyomás hatására történő lehajlási mechanizmusra vezeti vissza a szenzor áramlási sebességtől és egyéb mechanikai behatásoktól való függését.

A 3. fejezetben a bioanyagok alkalmazása szempontjából fontos fehérjerezisztens polimerekről volt szó. A Dr. Laurance Ruiz kollégám által szintetizált foszforilkolin tartalmú poliuretánok vékony rétegként, integrált optikai szenzor felületén való alkalmazása lehetővé tette, hogy kvantitatív fehérjeadszorpciós vizsgálatot végezzünk ilyen polimereken is. Ez az első példa az OWLS technika polimer felületek adszorpciós tulajdonságainak karakterizálására történő alkalmazására. A fejezet második részében pedig egy vízben oldódó polimer a PLL-g-PEG kötődési mechanizmusát és fehérjerezisztens tulajdonságának vizsgálatát tudtuk elvégezni az integrált optikai szenzor segítségével. A felületek XPS-el és ToFSIMS-el való tanulmányozása után az OWLS technika segítségével kimutattuk, hogy a polimer ionos kölcsönhatással kapcsolódik a fém-oxid felületekhez illetve, hogy kiváló fehérjerezisztens tulajdonságokkal rendelkezik. Humán szérum adszorpcióját vizsgálva a kezelt felületeken több, mint 95%-os fehérjeradszorpció csökkenést tapasztaltunk. Ez az eredmény fehérjeadszorpció csökkentése terén a világ élvonalába tartozik. A polimer könnyű alkalmazhatósága és stabilitása is hozzájárult ahhoz, hogy a PLL-g-PEG fém-oxid felületekre történő alkalmazását szabadalmaztassuk is. Az elért eredményeket felhasználva a polimer továbbfejlesztése, funkciós csoportokkal való ellátása már folyamatban van. Ezeknek a funkciós csoportoknak segítségével, a polimer fehérjerezisztens tulajdonságának kihasználásával olyan szenzorok kifejlesztését reméljük, amelyek csak specifikus célmolekulákat mérnek nagy pontossággal.

A 4. fejezet az OWLS technika egyik első olyan alkalmazásáról számol be, ahol a szenzor felületén lévő sejtek kollektív viselkedését tanulmányoztuk. A módszer rendkívüli érzékenysége illetve a folyamatok jó időfelbontással történő követésének lehetősége révén alkalmasnak bizonyult a sejtek és a felületek kölcsönhatásának vizsgálatára. A sejtek alakváltozásának mérése lehetőséget adott a szenzor toxikológiai célra történő felhasználására. Modell toxinként NaOCl –t használva ki tudtuk mutatni, hogy 0.02% feletti koncentráció tartomány már hatással van a sejtekre. Jelenleg hormonérzékeny sejteket használva hormonkoncentrációt meghatározó szenzor fejlesztésén dolgozunk. A sejtek hatására történő félértékszélességének változás magyarázatakor, a folyamat megértése az OWLS elméletének struktúrált felületekre történő alkalmazásához vezetett. Itt érdekes jelenségekre bukkantunk, amiknek megértése és a kihasználási lehetőségeiknek feltérképezése még folyamatban van.

Az 5. fejezet a két előző fejezet eredményeire építve egy új alkalmazási területet mutat be. Mikrocsatornákat használva sikerült elérnünk, hogy a szenzorfelületen a sejtek az általunk eltervezett mintát követve kapcsolódjanak. Az OWLS mérőműszer módosításával ki tudtuk mutatni, hogy a sejtadhézió hűen követi a fehérjék adszorpcióját, amit viszont a PLL-g-PEG segítségével kontrolláltunk. A felület egyes részeinek külön-külön történő mérésével, és a mikrocsatornák segítségével rendkívül változatos mérések tervezésére van lehetőségünk. (Például ugyanabban a küvettában, ahol a mérést végezzük, a PLL-g-PEG kezelt felületet referenciaként használhatjuk a párhuzamos OWLS mérések során.) Jelenleg a PLL-g-PEG mikrokontakt nyomtatásával, illetve a módosított polimerekből kialakított strukturált szenzorfelületek létrehozásával próbálkozunk.

A dolgozatom nem egy lezárt kutatást mutat be, hanem az elért eredmények alapot jelentenek a munka folytatására, mind a fehérjerezisztens polimerek, mind a sejtek, mind a struktúrált szenzorfelületek terén.

7 TÉZISEK

7.1 A kutatás tárgya és célkitűzései

A biotechnológia korunk egyik legjobban fejlődő iparága. Termékeit: gyógyszereket, gyógyászati segédeszközöket, implantátumokat, analitikai módszereket stb. naponta használjuk, ezért nem véletlen, hogy az egyik legjobban finanszírozott kutatási területnek is számít. Az élő szervezettel való érintkezés újfajta kihívást jelent az anyagkutatásnak. A bioanyagok fogalom magában hordozza a biokompatibilis, azaz a szervezetből káros reakciót nem kiváltó anyagokat éppúgy, mint a bioszenzorokon használt, a szervezet valamelyik részével reagáló anyagokat. Hagyományosan a biológiában a kutatók homogén oldatban vizsgálták a reakciókat, az utóbbi időben azonban új kísérleti lehetőségek lehetővé teszik számunkra, hogy a reakciókat a határfelületen vizsgáljuk.

A 70-es években jött létre az integrált optika. Lassan indult útjára, de villámgyors fejlődés jellemzi, az egész világon optikai hullámvezetőket alkalmaznak a telekommunikáció terén. Míg az optikai hullámvezető a távközlés szolgálatában környezetétől elszigetelt, a szenzor-technológia terén nagyon érzékenyen kell reagálnia környezete változásaira. Ez a feladat határozza meg a szenzorok számára alkalmazott hullámvezető felépítését is. Az integrált optikai szenzor egy kényelmes megvalósítása a fényt optikai ráccsal hullámvezetőbe becsatoló szenzor (**O**ptical **W**aveguide **L**ightmode **S**pectroscopy). Néhány száz nanométer vastagságú sík hullámvezetőben csak meghatározott számú diszkrét fénymódus lehetséges. Ezeknek a módusoknak energiaértékei (azaz a fázissebesség vagy az N effektív törésmutató) diszkrét sorozatot alkotnak, amiknek mérésével információt szerezhetünk a felületen lezajló reakciókról. Egy ilyen integrált optikai szenzornak, a hozzá tartózó mérőműszernek és szoftvernek a kifejlesztése volt a feladatom a doktori munkám első két évében a Mikrovákuum KFT-nél. A sikeres szenzorfejlesztés után, ennek az integrált optikai mérési módszernek (OWLS) továbbfejlesztésén dolgoztam. A feladatom a hullámvezető szenzornak a módosítása volt, illetve újfajta fizikai és biológiai alkalmazási lehetőségek keresése.

7.2 Kísérleti módszerek

A bioanyagok fehérjeadszorpciós tulajdonságainak vizsgálata csak a felületek fizikai és kémiai tulajdonságainak gondos karakterizálása nélkül nem képzelhető el. Könnyen előfordulhat ugyanis, hogy a felületeken jelen lévő egyenetlenségek, szennyeződések, és egyéb tényezők nagy mértékben befolyásolják a mérési eredményeket. Az általam használt felületanalizáló módszerek a következők voltak:

Atomi erő mikroszkópia (AFM), amit főleg a szenzorfejlesztés során használtam az optikai rács vizsgálatára illetve a felület érdességének mérésére.

Röntgen fotoelektron spektroszkópia (XPS), amit a felület kémiai tulajdonságainak és a szennyeződés mértékének a megállapítására, valamint a vékony rétegek karakterizálására használtam.

ToFSIMS (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy), ami a legfelső atomi réteg összetételéről adott fontos információt.

Nedvesítési szög és mikrocseppek kondenzációjának mérése, ami a felületeken jelenlevő esetleges makroszkópikus hibákat, illetve a létrehozott mintázatokat mutatja ki.

A kutatásaim gerincét alkotó méréseket az OWLS módszerrel végeztem. Az itt használt szenzor két fő részből áll: egy üveghordozóra felvitt vékony, nagy törésmutatójú hullámvezető rétegből, és az ezen lévő optikai rácsból, aminek segítségével lehet a hullámvezető módusait gerjeszteni. A gerjesztés He-Ne lézer segítségével történik, és csak két jól meghatározott beesési szög esetén jön létre. Ez a két beesési szög megváltozik, ha a felületen vagy annak közelében bármilyen törésmutató változás történik. Ezt kihasználva, az OWLS mérőműszerrel a beesési szögeket folyamatosan nyomon követve kvantitatív információt nyerhetünk a felületen lezajló adszorpciós folyamatokról 1ng/cm^2 (kb. egy század monoréteg fehérje) pontossággal.

7.3 Új tudományos eredmények

Integrált optikai szenzor készítése

Az OWLS mérőműszerekben használt integrált optikai szenzornak, a hozzá tartozó mérőműszernek és szoftvernek a fejlesztésében vettem részt a doktori munkám első két évében a Mikrovákuum KFT-nél. Az itt végzett munkám eredménye az a jelenleg a világon egyedül nálunk gyártott szenzor lett, amit a kutatásaim során is végig használtam.

Nyomás és áramlás mérése újfajta optikai módszerrel

Az OWLS technika áramlási sebességtől és egyéb mechanikai behatásoktól való függése ismert zavaró jelenség volt a módszert használó kutatók körében. Ennek a zavaró jelenségnek a vizsgálatára tervezett, illetve a Dr. Csúcs Gábor által elvégzett mérések adataira támaszkodva sikerült olyan modellt készítenem, ami a jelenséget nyomás hatására történő lehajlási mechanizmusra vezeti vissza. Ennek a modellnek a segítségével kimutattam, hogy az integrált optikai szenzor érzékenységének köszönhetően nyomás és áramlási sebesség mérésére is használható, ami fontos lehet extrém körülmények közötti nyomásmérés során.

Az OWLS technika alkalmazása polimerekre

A bioanyagok és a szervezet kölcsönhatásának tanulmányozásakor fontos információt jelent a felületi biomolekula adszorpció vizsgálata. A szenzor felületére felvitt vékony foszforil-kolin-poli-uretán (PCPUR) rétegen elvégzett fehérje és lipid adszorpciós méréseim nem csak a polimer kíváló biokompatibilitására mutattak rá, hanem megnyitották az utat a bioanyagok egy új csoportjának, a polimereknek, ezzel az integrált optikai módszerrel történő vizsgálatához. (Ez volt ugyanis az első példa az OWLS technika polimer felületek adszorpciós tulajdonságainak karakterizálására történő alkalmazására.) Az aktiváló fehérjékhez tartozó fibrinogén és a γ-globulin adszorpciójában több, mint 80 százalékos, míg a humán szérum albuminnál (HSA) illetve a lipideknél 95 százalékos csökkenést tapasztaltunk a PCPUR felületeken. Ez utóbbiak esetében az adszorbeálódott tömeg abszolút értéke kevesebb, mint 5 ng/cm^2, ami már a műszer érzékenységi határának nagyságrendjébe esik. HSA és fibrinogén azonos mértékben kötődik a két különböző PCPUR polimerhez, de kevesebb IgG-t találtunk a magasabb foszforilkolin tartalmú PCPUR167 esetében.

Az integrált optikai szenzorral méréseket tudtam végezni a fém oxid felületeken monomolekuláris réteget létrehozó, és szintén fehérjerezisztens tulajdonsággal rendelkező poli-L-lizin-poli-etilén-glikol (PLL-g-PEG) polimeren. Kimutattam, hogy a felületre adszorbeálódó polimer mennyisége függ a pH-tól és a felület izoelektromos pontjától. A polimer kíváló fehérjerezisztens tulajdonságának köszönhetően nem csak egyes fehérjék, hanem humán szérum adszorpcióját is tesztelni tudtam. Három felületet vizsgáltam: TiO_2, Nb_2O_5 és $Si_{0.4}Ti_{0.6}O_2$. A PLL-g-PEG réteg nagy mértékben csökkentette a fehérjék adszorpcióját mindegyik felületen. A kapott értékek mindhárom felületen legalább tízszer kisebbek a PLL-g-PEG bevonat nélküli értékeknél, helyenként pedig olyan kicsik, hogy a mérések egy részénél az 1ng/cm^2-es érzékenységi határ alatt maradtak. Ez szérum esetében kiugróan jó fehérjerezisztens tulajdonságnak számít. Azt is teszteltem, hogy többszöri mérés során mennyire stabil a PLL-*g*-PEG réteg, illetve hogy mennyire őrzi meg a jó fehérjerezisztens tulajdonságát. Azt tapasztaltam, hogy több szérum-adszorpciós ciklus után sincs jelentős fehérjemennyiség a felszínen, illetve, hogy maga a réteg sem változik a kísérlet ideje alatt.

Az OWLS technika alkalmazása sejtek és felületek kölcsönhatásának vizsgálatára

A sejtek felületekhez tapadásakor lejátszódó folyamatok egyre nagyobb fontossággal bírnak a biokompatibilis anyagkutatásban. A fokális és közeli érintkezések kimutatásakor a mikroszkópok felbontási határukhoz érkeztek. Szükség van olyan módszerekre, amik segítenek ezen túllépve, a kötési folyamatokban fontos fehérjéket is figyelembe venni. Az aktiváló fehérjék fontossága régóta ismert az irodalomban. A sejteket felülethez kötő szerepük jobb megértéséhez nyújthat segítséget az OWLS technika, kiváltva más indirekt, idő és költségigényes sejtkultúrás kísérleteket. Eddig ezt a módszert főleg nanoméretű biomolekulák adszorpciójának vizsgálatára alkalmazták, nekem sikerült - a világon elsőként - stabil, könnyen kezelhető és reprodukálható OWLS méréseket végeznem oszteoblaszt sejteken. Kimutattam, hogy a sejtek szétterülésének kinetikája tanulmányozható az integrált optikai szenzor segítségével. A sejtek morfológiai változásának nyomonkövetésére alapozva pedig egy újfajta cito-toxikológiai alkalmazást dolgoztam ki. A modell toxikus anyagnak választott nátrium-hipoklorid (NaOCl) hatására a sejtek összehúzódással válaszolnak. Több ilyen mérést végezve különböző koncentrációjú NaOCl-t használva megállapítható egy kritikus koncentráció (0.02%), aminél nagyobb koncentrációkra a

rendszer reagál. Külön teszteltem, hogy van-e különbség a fluoresszensen megjelölt sejteknek a toxikus anyagra való reagálásában. Ebben az esetben a jelölésnek nem volt számottevő hatása a toxikus válaszra.

A sejtek szétterülésének vizsgálata során az OWLS csúcsok félértékszélességének érdekes változását tapasztaltam. Ennek magyarázata az, hogy a sejtek, méretük miatt, optikai szempontból egy felületi inhomogenitást képviselnek. Ahogy egyre nagyobb részt foglalnak el a hullámvezető felszínétől számított 200 nm-es sávban – a hullámtérben, ahol a rendszer érzékeny – egy darabig a csúcsok félértékszélessége nő. Az 50%-os lefedettség után azonban a felület megint egyre homogénebb lesz, mert egyre nagyobb helyet fednek le a sejtek, így a félértékszélesség ismét csökken. Ezért a félértékszélesség mérésével egy alternatív módot találtam arra, hogy a felület lefedettségét mérjük. Ez az első eset, hogy az OWLS technika alkalmazása során nem csak a csúcsok helyének változásából, hanem azok alakjából is információt nyerünk ki.

Az OWLS technika alkalmazása mintázatok karakterizálására

A modern biológiai szenzortechnológiában a fejlődés és kutatás egyik fő iránya, hogy hogyan lehetne a már létező mérési eljárásokat felgyorsítani és a szenzorokat olcsóbbá tenni. Ennek érdekében a mikroelektronikához hasonlóan egyre inkább előtérbe kerül a miniatürizálás fontossága. A szenzorokat minél több, jellemzően 1-100 μm karakterisztikus méretű elkülönülő részre felosztva megnövelhető a műszerek hatásfoka. Ilyen mintázatok segítségével lehetőség nyílt olyan szenzorok készítésére, amelyeken egy időben több mintát lehet mérni, vagy egy mintán egyszerre többféle mérést lehet elvégezni. A mintázatok készítésére az utóbbi időben egyre gyakrabban használják a mikrokontakt nyomtatást (microcontact printing), vagy a mikrocsatornákat (microfluidic networks). Használva a fehérjerezisztens polimerekkel elért eredményeket és a sejtes mérésekből tanultakat, sikerült sejtmintázatokat előállítanom. Ehhez először a mikrocsatornás eljárással PLL-*g*-PEG -el bevont csíkokat készítettem a hullámvezetőre, majd végrehajtottam egy standard sejtes mérést. Az OWLS technika módosításával lehetőség nyílt a hullámvezető egy részét végigpásztázó méréseket végezni. Ennek segítségével kimutattam, hogy a sejtek – a fehérjék adszorpcióját követve – csak a PLL-g-PEG -el nem bevont részeken tapadnak meg.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Itt szeretnék köszönetet mondani azoknak, akik a négy év alatt segítettek a kutatómunkában.

Köszönet:

Dr. Papp Elemérnek, témavezetőmnek, akinek előrelátásának köszönhetem azt is, hogy egyáltalán belekezdtem ebbe a témába.

A Mikrovákuum Kft. kicsi, de lelkes gárdájának: Dr. Szendrő Istvánnak, Dr. Erdélyi Katalinnak, Némethné Sallai Margitnak, Fischer Katalinnak és a többieknek, akiknek tapasztalata és szakértelme, a kutatómunkához való hozzáállása példaértékű számomra.

Dr. Csúcs Gábornak és Horváth Róbertnek az integrált optikai szakterületen hosszú beszélgetésekért és szemléletformáló viták során nyújtott tudományos és emberi segítségükért.

Dr. Rozlosnik Noéminek és Glavák Csabának a sok türelemért, amit AFM mérések rejtelmeibe való bevezetésem során tanúsítottak.

Dr. Marcus Textornak és Dr. Nicolaus Spencernek, akik lehetővé tették a két éve Svájcban folytatott kutatómunkát.

Dr. Gregory Kenausisnak, Roman Grafnak, Dr. Laurence Ruiznek, Dr. Roger Kurratnak, Reto Kesslernek, Dr. Jeremy Ramsdennek és a többi svájci kollégámnak a kísérletek és azok megértése során nyújtott segítségükért.

És a családomnak, illetve barátainknak a biztos érzelmi és lelki háttérért, ami végig körülvett a munkám során.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFM (Atomic Force Microscope): atomi erő mikroszkóp.

AR-XPS (Angle Resolved XPS): állítható szögű XPS.

ASI (Artifitial Sensing Instruments): az OWLS műszert forgalmazó cég.

BIOS-1 (Biological Integrated Optical Spectroscope): az ASI által gyártott OWLS műszer.

CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope): konfokális lézer pásztázó mikroszkóp.

FBS (Fetal Bovine Serum): borjúembrió szérum.

Fg (Fibrinogen): fibrinogén.

FTIR (Fourier transformed Total Internal Reflection spectroscopy): Fourier transzformált teljes belső visszaverődés spektroszkópia.

GPC (Glycerophosphorylcholine): glicerofoszforilkolin.

HCCM (Hepes Containing Cell Culture Media): HEPES pufferolt sejtkultúra tápoldat.

HDI (Hexamethylene diisocyanate): hexametilén diizocianát.

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid): hidroxietil piperazin etánszulfonsav.

HEPES Z1: 10 mM HEPES puffer, 8 M NaOH –val pH=7.4 –re titrálva.

HSA (Human Serum Albumin): humán szérum albumin.

IgG: γ-globulin.

I-ToFSIMS (Imaging ToFSIMS): pásztázó ToFSIMS.

OWLS (Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy): optikai hullámvezető módus spektroszkópia.

PC (phosphorylcholine): foszforilkolin.

PCPUR (phosphorylcholine polyurethane): foszforilkolin poliuretán.

PDMS (polydimethylsiloxane): polidimetil-sziloxán.

PEO (PEG) (polyethylene oxid (glycol)): polietilén oxid.

PLL-g-PEG (poly-L-lysine-g-polyethylene glycol): poli-L-lizin-g-polietilén-oxid.

RSA (Random Sequential Adsorption): véletlen egymásutániságú adszorpció.

SPR (Surface Plasmon Resonance): felületi plazmon rezonancia.

TE (Transverse Electric): transzverz elektromos.

TM (Transverse Magnetic): transzverz mágneses.

ToFSIMS (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy): repülési idő másodlagos ion tömegspektroszkópia.

XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy): röntgen fotoelektron spektroszkópia.

IRODALOMJEGYZÉK

1 I. Newton, Opticks, 4th ed., Book 3, Qu. 29 (William Innys, London,1730).

2 Horváth Róbert, ELTE diploma munka, 1998.

3 de Feijter, J. A., Benjamins, J., and Veer, F. A., "Ellipsometry as a tool to study the adsorption of synthetic and biopolymers at the air-water Interface", *Biopolymers*, **17**, 1759-1773 (1978).

4 B.E. Yoldas, J. Non-Cryst. Solids 38-39:81 (1980)

5 K. Heuberger and W. Lukosz, Appl. Optics 25:1499(1986).

6 G. Csúcs, The application of OWLS to Biomembrane-Protein Interactions, Dissertation ETH Zürich, (1998)

7 O. Wichterle and D. Lim, *Nature,* **185**, 117 (1960).

8 A. J. Aleyamma and C. P. Sharma, in: *Blood compatible materials and devices: perspectives towards the 21st century,* p. 123, C. P. Sharma and M. Szycher (Eds.), Technomic Publishing, Lancaster (1991).

9 S.-H. Hyon, W.-I. Cha, Y. Ikada, M. Kita, Y. Ogura and Y. Honda, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn,* **5**, 397 (1994).

10 J. H. Lee, H.B.Lee and J. D. Andrade, *Prog. Polym. Sci.,* **20**, 1043 (1995).

11 J. H. Lee, P. Kopeckova, J. Zhang, J. Kopecek and J. D. Andrade, *Polym. Mat. Sci. Eng.,* **59**, 234 (1988).

12 Y. Kadoma, N. Nakabayashi, E. Masuhara and J. Yamauchi, *Kobunshi Ronbunshu,* **35**, 423 (1978).

13 D. Chapman, *Langmuir,* **9**, 39 (1993).

14 J. A. Hayward and D. Chapman, *Biomaterials,* **5**, 135 (1984).

15 K. Ishihara, R. Aragaki, T. Ueda, A. Watenabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.,* **24**, 1069 (1990).

16 K. Ishihara, T. Ueda and N. Nakabayashi, *Polym. J.,* **22**, 355 (1990).

17 K. Ishihara, H. Oshida, Y. Endo, T. Ueda, A. Watenabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.,* **26**, 1543 (1992).

18 D. Chapman and S. A. Charles, *Chem. Brit.,* **28**, 253 (1992).

19 T. Ueda, A. Watanabe, K. Ishihara and N. Nakabayashi, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn,* **3**, 185 (1991).

20 K. Ishihara, N. P. Ziats, B. P. Tierney, N. Nakabayashi and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.,* **25**, 1397 (1991).

21 D. Chapman and G. P. Valencia, US patent n°4689386, Biocompatibles Ltd (1987).

22 A. Walliser, *"Caracterisation des interactions liquide-fibres élémentaires par mouillage"*, thesis Université de Haute Alsace (F), 92-MUHL-0248 (1992).

23 L. Ruiz, E. Fine, J. Vörös, S.A. Makohliso, D. Léonard, D.S. Johnston, M. Textor, H.J. Mathieu, Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, **10**, 931 (1999)

24 A. P. v. d. Heiden, G. M. Willems, T. Lindhout, A. P. Pijpers and L. H. Koole, *J. Biomed. Mater. Res.,* **40**, 195 (1998).

25 M. D. Lelah and S. L. Cooper, *Polyurethanes in Medicine,* CRC press, Boca Raton, FL (1986).

26 M. Kojima, K. Ishihara, A. Watenabe and N. Nakabayashi, *Biomaterials,* **12**, 121 (1991).

27 Y. Iwasaki, S. Tanaka, M. Hara, K. Ishihara and N. Nakabayashi, *J. Colloid Interf. Sci.,* **192**, 432 (1997).

28 K. Ishihara, R. Aragaki, J. I. Yamazaki, T. Ueda, A. Watenabe and N. Nakabayashi, *Seitai Zairyo,* **8**, 231 (1990).

29 K. Ishihara and N. Nakabayashi, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.,* **29**, 831 (1991).

30 D. Chapman, R. M. Williams and B. D. Ladbrooke, "Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins)", *Chemistry and Physics of Lipids,* **1**, 445-475 (1967).

31 N. J. Salsbury, A. Darke and D. Chapman, "Deuteron magnetic resonance studies of water associated with phospholipids", *Chemistry and Physics of Lipids,* **8**, 142-151 (1972).

32 E. G. Finer and A. Darke, "Phospholipid hydration studied by deuteron magnetic resonance spectroscopy", *Chemistry and Physics of Lipids,* **12**, 1-16 (1974).

33 E. G. Finer, "Interpretation of deuteron magnetic resonance spectroscopic studies of the hydration of the macromolecules", *Journal of the Chemical Society, Faraday transaction II,* **69**, 1590-1600 (1973).

34 Y. Iwasaki, K. Ishihara, N. Nakabayashi, G. Khang, J. H. Jeon, J. W. Lee and H. B. Lee, "Platelet adhesion on the gradient surfaces grafted with phospholipid polymer", *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition,* preprint (1998).

35 Kiss E, Samu J, Tóth A, Bertóti I, (1996) Langmuir 12: (6) 1651-1657.

36 BjorlingM. (1992). Macromolecules **25**: 3956-3970.

37 Isreals R., F. A. M. Leermakers, et al. (1995). Macromolecules **28**: 1626-1634.

38 Jeon, S. I., J. H. Lee, et al. (1991). J. Colloid and Interface Sci. **142**(1): 149-166.

39 Claesson, P. (1993). "Poly(ethylene oxide) surface coatings: relations between intermolecular forces, layer structure and protein repellancy." Colloids Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects **77**: 109-118.

40 Schroen, C. G. P. H., M. A. C. Stuart, et al. (1995). "Influence of preadsorbed block copolymers on protein adsorption: Surface properties, layer thickness, and surface coverage." Langmuir **11**: 3068-3074.

41 Elbert, D. L. and J. A. Hubbell (1998). "Reduction of fibrous adhesion formation by a copolymer possessing an affinity for anionic surfaces." J. Biomed. Mater. Res. **42**: 55-65.

42 G. Kenausis, J. Voros, D. L. Elbert, M. Textor, J. A. Hubbell, J. Phys. Chem B, beküldve publikálásra

43 Hoogeveen, N. G., M. A. C. Stuart, et al. (1996). J. Colloid and Interface Sci. **182**: 133-145.

44 Hoogeveen, N. G., M. A. C. Stuart, et al. (1996). J. Colloid and Interface Sci. **182**: 146-157.

45 Ramsden, J. J.; Li, S. Y.; Prinosil, J. E. Cytometry 1995, 19, 97-102.

46 Divies, C. Ann. Microbiol. 1975, 126, 175-186.

47 Macholan, L.; Schanel, L. Biologia 1984, 39, 1191-1197.

48 Arnold, M. A.; Rechnitz, G. A. Anal. Chem. 1981, 53, 515-518.

49 Rechnitz, G. A.; Riechel, T. L.; Kobos, R. K.; Meyerhoff, M. E. Science 1977, 199, 440-441.

50 Aizawa, M. In New challenges in organic electrochemistry; Osa, T., Ed.; Gordon and Breach: Amsterdam, 1998, pp 339-356.

51 Sastry, C. A. 1995; Wiley: Singapore; 315-337.

52 Mulchandini, A.; Mulchandini, P.; Kaneva, I.; Chen, W. Anal. Chem. 1998, 70, 4140-4145.

53 McConnell, H. M.; Owicki, J. C.; Parce, J. W.; Miller, D. L.; Baxter, G. T.; Wada, H. G.; Pitchford, S. Science 1992, 257, 1906-1912.

54 Fredriksson, C.; Kihlman, S.; Rodahl, M.; Kasemo, B. Langmuir 1998, 14, 248-251.

55 Rodahl, M.; Hook, F.; Fredriksson, C.; Keller, C.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Vionova, M.; Kasemo, B. Farad. Diss. 1997, 107.

56 Burmiester, J. S.; Olivier, L. A.; Reichert, W. M.; Truskey, G. A. Biomaterials 1998, 19, 307-325.

57 Chittur, K. K. Biomaterials 1998, 19, 301-305.

58 Sudo, H.; Kodama, H.; Kasai, S. J. Cell Biol. 1983, 96, 191-198.

59 Kodama, H.; Amagai, Y.; Sudo, H.; Kasai, S.; Yamamoto, S. Jpn. J. Oral Biol. 1981, 23, 899-901.

60 R. Kurrat, M. Textor, J. J. Ramsden, P. Böni, N. D. Spencer, Rev. Sci. Instrum. 1997, 68(5), 2172-2176.

61 Nellen, P.M. (1993). Integrated optical input grating couplers as direct chemo- and biosensors. *PhD. Diss. ETH Zürich* No. **9871**.

62 Honig, M. G.; Hume, R. I. J. Cell Biol. 1986, 103, 171-187.

63 Ragnarson, B.; Bengtsson, L.; Haegerstrand, A. Hystochemistry 1992, 97, 329-333.

64 J. Vörös, R. Graf, G. L. Kenausis, A. Bruinink, M. Textor, E. Wintermantel, N.D. Spencer, Biosensors and Bioelectronics, beküldve publikálásra

65 A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard, H Biebuyck, Langmuir Lett. 1998, 14, 2227

66 R. Kurrat, Diss. ETH Zürich No. **12891**, 1998.