

# Nanostrukturált felületek és idegszöveti sejtek köölcsönhatásának vizsgálata

PhD értekezés

Sztyéhlikné Bérces Zsófia

Témavezetők:  
dr. Pongrácz Anita  
dr. Iván Kristóf



PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM INFORMÁCIÓS TECHNOLÓGIAI ÉS  
BIONIKAI KAR

ROSKA TAMÁS MŰSZAKI ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

2018.

## 1. Összefoglaló

Az idegszövetrel kommunikáló eszközök technológiája, a mérő és az idegrendszer működésébe elektromosan beavatkozó elektródok fejlesztése napjainkban igen intenzíven kutatott területek. Az ilyen eszközök lehetővé teszik olyan súlyos neurológiai kórképek kezelését, mint például a Parkinson kór, dystonia, esszenciális tremor vagy az epilepszia, melyek esetében a hagyományos gyógyszeres terápia alkalmazása nem vezet a kívánt eredményre rövid, vagy hosszú távon. Ezáltal javítható a páciensek életminősége. Szintén felhasználhatóak olyan agy-gép interfészek alkotóelemeiként, melyek segítségével tetraplég vagy locked-in szindrómás betegek képesek lehetnek a környezetükkel kapcsolatot teremteni, esetleg önmagukat részlegesen ellátni. Azonban az ilyen eszközök megbízható használatához szükséges számos lokálisan aktív neuron-hálózat vagy akár egy-egy idegsejt egyedi jelének regisztrálása. Ez a jelenlegi nem invazív megoldásokkal, például EEG-vel nem lehetséges, mivel a számos idegsejt elektromos jele a skalpon elhelyezkedő elektródok nagy mérete és a szövetből való távolsága miatt átlagolódik. Emiatt szükséges olyan eszközök használata, melyek a sejtekhez közel, a szövetben képesek mérni az idegrendszer elektromos jeleit. Azonban az ilyen invazív eszközök, mint például a MEMS technológiával előállított, szilícium alapú mikromegmunkált elektródok működési élettartama erősen korlátozott az élő szövet védekező mechanizmusa miatt. A beültetett eszköz körül hegszövet alakul ki, mely elektromos szigetelőként funkcionál az idegsejtek és az elektromos kontaktusok közt, ezzel rontva a jel/zaj viszonyt. Emellett a folyamatban résztvevő mikroglia és reaktív asztroglia sejtek olyan gyulladáskeltő és neurotoxikus faktorokat bocsátanak ki, melyek a környező, még nem sérült neuronok pusztulását is okozzák, és gátolják az idegi regenerációt a sérült szövetben. A sérülés környezetében kialakuló szöveti védekező reakció ezért jelentősen megnehezíti az *in vivo* mérések helyes interpretációját, mivel néhány nap vagy hét alatt csökkent érzékenységhez, stabilitáshoz, és gyakran végül az eszköz működésének ellehetetlenítéséhez vezet.

A sejtek a natív mikrokörnyezetükben az extracelluláris mátrix háromdimenziós nanoméretű struktúráival érintkeznek, és azok is befolyásolják működésüket. Ezért az implantátumok felületi topográfiájának módosítása lehetőséget biztosíthat a természetes környezetet imitáló mesterséges felület kialakítására, és ez által pozitívan hathat a sejtek viselkedésére.

Munkám során egy levilágító maszk használata nélküli mikrotechnológiai eljárással készülő nanostruktúrálási módszerrel, az úgynevezett fekete-szilícium módszerrel foglalkoztam, és annak az idegi implantátum felületére való integrálhatóságának lehetőségeit és hatásait vizsgáltam. A mély reaktív ionmarással készülő nanostruktúrák gyártása az elektródgyártás MEMS technológiai sorába integrálható. A nanostrukturált és fémmel bevont felületek a

síkfelületűnél nagyobb fajlagos felületű kontaktálási felszínt nyújthatnak, ezáltal alacsonyabb impedanciát és jobb jel/zaj viszonyt biztosíthatnak a mérésekhez.

Először a nanostruktúrák gyártási paramétereinek a kialakuló felszín morfológiájára gyakorolt hatásait ismertetem. Ezután bemutatom az *in vitro* és *in vivo* biológiai méréseink eredményeit. *In vitro* vizsgáltuk egy neuroektodermális őssejtvonal (NE-4C) idegi őssejtjei és az ezekből fejlődő idegszöveti sejtek, valamint egy immortalizált mikroglia sejtvonal (BV2) sejtjei és az agyszövetből közvetlenül izolált asztroglia sejtek viselkedését sík felszínű és nanostrukturált, szilícium és platina modellfelületeken. Úgy találtam, hogy a sejtek tapadási és osztódási tulajdonságai, és ezáltal életképessége sejttypus, valamint felszíni kémia és topográfia-függő eltéréseket mutatnak. Dolgozatomban ismertetem a krónikus *in vivo* méréseink eredményét, amelynek során patkány élő agyszövetében vizsgáltuk a mikro- és nanostrukturált felületek kémiájának és topográfiájának hatását a gliareakció kialakulására és az implantátum közelében lévő idegsejtek túlélésére.

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az ismertett nanostrukturálási módszer alkalmas lehet a MEMS alapú idegi implantátumok felületének módosítására, hogy ez által hosszabb távú, megbízhatóbb méréseket tegyenek lehetővé. Megfigyeléseinket azonban krónikus *in vivo* elektromos mérésekkel még szükséges megerősíteni.

## 2. Abstract

Neural interface technologies, including the development of recording and stimulating electrodes are highly investigated fields of biomedical engineering. Implanted devices aim to treat patients with serious neurological disorders as Parkinson's disease, essential tremor or dystonia [1] which are non-responsive to drug treatments. Brain prostheses can be used also as parts of brain machine interfaces (BMI) for patients with various disabilities. Recording action potentials from individual neurons is impossible with non-invasive electrodes, like EEG, because the neuronal spiking is lost by averaging and filtering across the scalp. The lifetime of invasive recording devices such as microfabricated neural probes is, however, limited by the foreign body response (FBR) of the central nervous system.

FBR results in a neuronal cell loss and the formation of a glial scar, which insulates neurons from the recording sites electrically, which corresponds to the reduction of the Signal-to-Noise Ratio (SNR) of signal acquisition, thus impairing the functionality of the device. Moreover, reactive astrocytes release proinflammatory and neurotoxic factors that lead to neuronal death and degeneration, and inhibit axonal regrowth and regeneration. The immune response around the neural implant can modify the appropriate interpretation of *in vivo* recordings, since it leads to reduced sensitivity, stability and very often to device failure.

As cells in their native microenvironment interact with 3D nanoscale structures of the extracellular matrix, topographical modification of implant surfaces may provide an alternative solution to the negative tissue response. Imitating the structure of the native environment affects the attachment and behavior of neurons and glial cells.

In the presented PhD theses, I investigated a maskless cryogenic nanostructuring method, the black silicon method and its possible application for tuning the topography of brain implant surfaces. The advantage of the fabrication scheme is that it can be integrated into the fabrication process of the MEMS microelectrodes. Nanostructured, metallised contact surfaces provide a higher specific surface area and therefore a better SNR.

First, I discuss the effect of the fabrication parameters for producing the surface morphology composed of black silicon regions. Next, I move on to the description and explanation of the results regarding the *in vitro* and *in vivo* investigations on the interactions of the fabricated surfaces with living cells and neural tissue. *In vitro* studies, the adhesive behaviour of NE4C neural stem cells, BV2 immortalised microglia cells and primary astroglial cells are investigated on flat and nanostructured silicon and platinum surfaces. In the chronic *in vivo* study, the effects of the micro- and nanostructured surface topography and surface chemistry were investigated on the development of the glial scar and on the number of surviving neurons in the vicinity of the implant.

My results suggest that the presented nanostructuring method may provide more reliable neural electrodes for long-term applications, however, it should definitely be confirmed by further studies focusing on the long-term quality of *in vivo* signals in the vicinity of the device.

### 3. Tartalomjegyzék

1. Összefoglaló .....	I
2. Abstract.....	III
3. Tartalomjegyzék .....	V
4. Ábrajegyzék.....	VIII
5. Táblázatok jegyzéke .....	XI
6. Rövidítések .....	XII
1. Bevezetés.....	1
1.1. Agyi potenciálok mérése .....	1
1.2. Célkitűzés .....	2
1.3. A központi idegrendszer végdifferenciált sejtjei .....	3
1.3.1. Neuronok .....	3
1.3.2. Asztroglia sejtek .....	3
1.3.3. Mikroglia sejtek.....	5
1.4. Reaktív gliózis.....	7
1.4.1. A gliózis fogalma.....	7
1.4.2. A gliózis lefolyása .....	8
1.5. Idegi őssejtek szerepe gliózisban és a regenerációban .....	10
1.6. Biokompatibilitás .....	10
1.7. MEMS technológia.....	14
1.7.1. Fotolitográfia .....	16
1.7.2. Vékonyrétegek kialakítása.....	17
1.7.3. Vezető mintázat kialakítása: lift-off technika.....	17
1.7.4. Felületi és tömbi mikromegmunkálás kémiai és fizikai marással .....	17
1.7.5. Chipek kialakítása: fűrészelés vagy kontúrmarás .....	18
2. Kísérleti módszerek .....	19
2.1. Fluoreszcens mikroszkópia.....	19
2.2. Pásztázó elektronmikroszkópia .....	20
2.3. Fotometriás mérések.....	20
2.4. Biológiai mérésekben használt modellezési szintek és vizsgálható tulajdonságok ..	21
3. Alkalmazott mérési eljárások .....	24
3.1. A fekete szilícium nanostruktúrák készítése és vizsgálata .....	24
3.1.1. Nanostrukturálási eljárás mechanizmusa.....	24

3.1.2.	A polikristályos szilícium leválasztási hőmérsékletének hatása a kiindulási rétegre	26
3.1.3.	Nanostrukturált felületek karakterizációja.....	26
3.1.4.	Fajlagos felület mérése elektrokémiai módszerekkel .....	27
3.1.5.	A mérések helyszíne és résztvevői .....	28
3.2.	Immortalizált sejtek <i>in vitro</i> vizsgálatának körülményei.....	28
3.2.1.	Mintatervezés és gyártás.....	28
3.2.2.	Idegi őssejt és immortalizált mikroglia sejt kultúrák tenyésztési módszerei .....	29
3.2.3.	Életképesség és sejtletapadás vizsgálatok .....	30
3.2.4.	Indukció: idegsejtképződés <i>in vitro</i> .....	31
3.2.5.	Sejttenyészetek fixálása mikroszkópos vizsgálatokhoz.....	31
3.2.6.	Mikroszkópia .....	32
3.2.7.	A mérések helyszíne és résztvevői .....	33
3.3.	Primer sejtek <i>in vitro</i> vizsgálatának körülményei .....	33
3.3.1.	Primer egér asztroglia sejtek tenyésztése .....	33
3.3.2.	Primer asztroglia tenyészetek fixálása és festése.....	33
3.3.3.	Tenyészetek vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával.....	34
3.3.4.	Sejtszámok kvantitatív vizsgálata.....	34
3.3.5.	Tenyésztett sejtek morfológiai vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóppal ....	35
3.3.6.	A mérések helyszíne és résztvevői .....	35
3.4.	<i>In vivo</i> mérések körülményei.....	36
3.4.1.	Minták tervezése és gyártása .....	36
3.4.2.	Implantáció és a szövet előkészítése, immunfestések .....	37
3.4.3.	Fénymikroszkópia .....	38
3.4.4.	Képelemzés módszerei .....	39
3.4.5.	Statisztikai elemzés módszerei .....	40
3.4.6.	A mérések helyszíne és résztvevői .....	40
4.	Eredmények.....	41
4.1.	Eszköztervezés és gyártás.....	41
4.1.1.	Az elkészült nanostrukturák morfológiájának gyártási paramétereiktől való függése	41
4.1.2.	Fajlagos felületnövekedés.....	48
4.2.	Idegi őssejtek és immortalizált mikroglia sejtek <i>in vitro</i> vizsgálata.....	53
4.2.1.	NE-4C és BV2 sejtek életképességének és letapadásának kvantitatív vizsgálata	53
4.2.2.	Fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok eredményei .....	56

4.2.3.	<i>In vitro</i> idegsejtképződés vizsgálatainak eredményei.....	58
4.3.	Primer asztroglia sejtek <i>in vitro</i> vizsgálata.....	61
4.3.1.	Sejtszámok alakulása a különféle felületeken .....	61
4.3.2.	A sejtek morfológiája a különféle felületeken.....	63
4.4.	<i>In vivo</i> vizsgálatok.....	74
4.4.1.	Gliózis súlyossága a különféle felületek környezetében .....	74
4.4.2.	Idegsejtek túlélése az implantátum környezetében.....	76
4.5.	<i>In vitro</i> és <i>in vivo</i> biológiai mérések eredményének összefoglalása .....	80
5.	Tézisek.....	81
6.	Összefoglalás és hasznosíthatóság.....	84
7.	Publikációs jegyzék .....	87
7.1.	A tézisek alapjául szolgáló publikációk .....	87
7.2.	Egyéb publikációk .....	87
7.2.1.	Folyóiratcikkek.....	87
7.2.2.	Nemzetközi konferencia-kiadvány .....	87
7.2.3.	Poszterek.....	88
7.2.4.	Egyetemi konferencia-kiadványok .....	88
8.	Köszönetnyilvánítás .....	89
9.	Irodalomjegyzék.....	91
	Függelék.....	A
	Nanostrukturált minták létrehozásának technológiai sora.....	A
	<i>In vitro</i> mérésekhez használt minták gyártásának technológiai sora.....	A
	<i>In vivo</i> mérésekhez használt minták gyártásának technológiai sora.....	B



## 4. Ábrajegyzék

1. <b>ábra</b> Különbőféle agyi területekről származó asztrogliá sejt, GFAP festéssel megjelenítve.	4
2. <b>ábra</b> Nyugalmi állapotban levő, nyúlványos morfológiájú és aktivált, amöboid formát öltött mikroglia sejt.	6
3. <b>ábra</b> Fekete szilícium nanostruktúra képződés mechanizmusának sematikus rajza.	24
4. <b>ábra</b> A két különböző hőmérsékleten leválasztott polikristályos Si réteg reprezentatív AFM felvétele.	26
5. <b>ábra</b> Platina elektród CV görbéjének jellemző szakaszai, és az aktív felület meghatározásához felhasznált tartomány.	28
6. <b>ábra</b> <i>In vitro</i> tesztszelepek felépítése.	29
7. <b>ábra</b> <i>In vivo</i> vizsgálathoz használt minták és különbőféle felületeik.	36
8. <b>ábra</b> Az eszközök beültetési koordinátái és orientációja.	37
9. <b>ábra</b> GFAP-val és NeuN-nel festett szeletek fénymikroszkópos felvételén ImageJ szoftverrel kijelölt mérési tartományok az implantátum helye körül.	39
10. <b>ábra</b> O <sub>2</sub> térfogatáram változásának hatása a kialakuló nanostruktúrák oszlopsűrűségére és magasságára.	42
11. <b>ábra</b> Nanostruktúrák morfológiájának az O <sub>2</sub> térfogatáramtól való függése; reprezentatív SEM felvételek.	43
12. <b>ábra</b> Szelethőmérséklet változásának hatása a kialakuló nanostruktúrák oszlopsűrűségére és magasságára.	44
13. <b>ábra</b> Nanostruktúrák morfológiájának a marás hőmérsékletétől való függése; reprezentatív SEM felvételek.	45
14. <b>ábra</b> A nanostruktúrák morfológiai paramétereinek RF előfeszítéstől való függése.	46
15. <b>ábra</b> PoliSi-B kiindulási rétegből készült nanostruktúrák morfológiájának az RF előfeszítéstől való függése; reprezentatív SEM felvételek.	47
16. <b>ábra</b> Lokális mintatelítettség hatása a nanostrukturált felületek homogenitására.	47
17. <b>ábra</b> A teljes szelet nanostrukturált mintával való fedettségi arányának befolyása a kialakuló nanostruktúrák morfológiájára.	48
18. <b>ábra</b> a. Agyi elektródon található nanostrukturált, platinázott kontaktusok készítésének sematikus ábrája. b. Egy 15 nm Ti/100 nm Pt réteggel bevont nanostrukturált felület keresztmetszeti képe.	49
19. <b>ábra</b> Nanostrukturált, 15 nm Ti/100 nm Pt réteggel bevont elektródreprezentatív CV görbéje és a referencia felület CV görbéje.	50
20. <b>ábra</b> 15 nm Ti/100 nm Pt réteggel bevont nanostrukturált felület, és azonos fémezéssel ellátott SiO <sub>2</sub> referenciafelület reprezentatív EIS görbéi.	50
21. <b>ábra</b> NE-4C sejt életképesség-vizsgálatának eredményei 4 h illetve 24 h inkubációs idő után MTT redukációs teszt felhasználásával mérve.	54

<b>22. ábra</b> NE-4C sejtek letapadása (4 h) és túlélése a sejtmagokat festő DAPI fluoreszcencia-intenzitásának vizsgálatával, 4 h illetve 24 h inkubációs idő után. ....	54
<b>23. ábra</b> BV2 sejtek 4 h illetve 24 h inkubációs idő alatt mért sejtmenyiségei a sejtmagot festő DAPI fluoreszcens intenzitása alapján. ....	55
<b>24. ábra</b> NE-4C sejtek két csatornás fluoreszcens felvétele 4 órás inkubációs idő után a különféle felületeken. ....	57
<b>25. ábra</b> NE-4C sejtek két csatornás fluoreszcens felvétele 24 órás inkubációs idő után a különféle felületeken ....	57
<b>26. ábra</b> Indukált tenyészetekről DAPI fluoreszcens jelet felhasználva készült mozaikfelvételek.....	58
<b>27. ábra</b> Indukált sejtek háromcsatornás fluoreszcens felvétele nanostrukturált tenyésztőlemez felszínén.....	59
<b>28. ábra</b> 24h és 48h inkubációs idővel készült minták DAPI csatornán mért, sejtmagokat ábrázoló, 10x nagyítású mozaikfelvételei. ....	61
<b>29. ábra</b> A szilícium felületeken 24 illetve 48 órán keresztül inkubált primer asztroglia tenyészetek sejtsűrűségéhez normált sejtsűrűségek a négy vizsgált felületen.....	62
<b>30. ábra</b> Primer asztroglia sejtek tenyészete Si felületen.....	63
<b>31. ábra</b> Szilícium felületen fixált primer asztroglia sejt.....	64
<b>32. ábra</b> Szilícium felszínen található asztroglia sejt.....	64
<b>33. ábra</b> Szilícium és nanostrukturált Si felület határán található primer asztroglia sejt.....	65
<b>34. ábra</b> Erősen megnyúlt sejt fluoreszcens felvétele Si felületen.....	65
<b>36. ábra</b> Platina felületen tapadó primer asztroglia tenyészet fluoreszcens felvételei.....	67
<b>37. ábra</b> Platina felületen fixált primer asztroglia sejt SEM felvétele.....	67
<b>38. ábra</b> Platina felületen megfigyelt egymáshoz kapcsolódó sejtek SEM felvétele. ....	68
<b>39. ábra</b> Primer asztroglia sejtek háromcsatornás fluoreszcens felvétele nanostrukturált mintázott, platínával bevont felszínen ....	69
<b>40. ábra</b> Primer asztroglia sejtek mintázott Pt felszínen. Három csatornás felvétel.....	69
<b>41. ábra</b> Si-nanoSi határvonalon elhelyezkedő sejt SEM felvétele. ....	70
<b>42. ábra</b> Pt-nanoPt határon elhelyezkedő sejt SEM felvétele.....	70
<b>43. ábra</b> Si-nanoSi határon tapadó sejt SEM felvétele. ....	71
<b>44. ábra</b> Primer asztroglia sejt membránjának egy részlete sík szilícium és nanostrukturált szilícium felület határán. ....	71
<b>45. ábra</b> GFAP markerrel festett idegszövet metszet fénymikroszkópos felvétele az implantáció helyéhez közel és intaktnak tekintett távolságban.....	74
<b>46. ábra</b> A gliózis súlyosságának kvantitatív elemzése a GFAP festődés intenzitásának változása alapján az implantáció helyétől való távolság függvényében.....	75
<b>47. ábra</b> NeuN markerrel festett idegszövet metszet fénymikroszkópos felvétele az implantáció helyéhez közel és intaktnak tekintett távolságban ....	76

<b>48. ábra</b> Az implantátum közelében túlélő idegsejtek számának kvantitatív elemzése a neuronok NeuN festésével meghatározott sejtszámok változása alapján az implantáció helyétől való távolság függvényében.....	77
<b>49. ábra</b> Két egymást követő (egymástól 60 $\mu\text{m}$ távolságban levő) szöveti metszet GFAP és NeuN festése az implantáció helyének közelében.....	78

## 5. Táblázatok jegyzéke

<b>1. táblázat</b> A munka során felhasznált fluoreszcens festékek gerjesztési és emissziós maximumai .....	19
<b>2. táblázat</b> A munka során felhasznált nanostrukturált minták különféle marási paramétereinek összefoglalása. ....	25
<b>3. táblázat</b> NE-4C sejtekkel és BV2 sejtekkel végzett kísérletek összefoglalása.....	32
<b>4. táblázat</b> Primer asztrogliá sejtekkel végzett mérések összefoglalása .....	35
<b>5. táblázat</b> Élő agyszövetben végzett mérések összefoglalása .....	40
<b>6. táblázat</b> Nanostrukturák morfológiai paramétere különböző O <sub>2</sub> térfogatáramoknál.....	42
<b>7. táblázat</b> Az elkészült nanostrukturák morfológiai paramétere különböző szelethőmérsékletek esetén.....	44
<b>8. táblázat</b> Az elkészült nanostrukturák morfológiai paramétere különböző RF előfeszítések alkalmazásánál.....	46
<b>9. táblázat</b> A különféle marási paraméterekkel készült 15 nm Ti/100 nm Pt felülettel bevont minták fajlagos felületnövekedése a referenciefelszínhez képest.....	51
<b>10. táblázat</b> <i>In vitro</i> és <i>in vivo</i> biológiai mérések eredményeinek összefoglalása.....	80

## 6. Rövidítések

ATP	Adenozin-trifoszfát
B50 sejtek	Patkány immortalizált idegsejtvonal
BB	Bisbenzimid (2'-(4-Ethoxyphenyl)-6-(4-methyl-1-piperazinyl)-1 <i>H</i> ,3' <i>H</i> -2,5'-bibenzimidazole)
BV2	Egér immortalizált mikroglia sejtvonal
CV	Cyclic Voltammerty, Ciklikus voltammertia
DAPI	2-(4-Amidinophenyl)-1 <i>H</i> -indole-6-carboxamidine
DBS	Deep Brain Stimulation, Mély agyi stimuláció
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DRIE	Deep Reactive Ion Etching, Mély reaktív ionmarás
ECM	Extracellular Matrix, Extracelluláris mátrix
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EEG	Electrocephalography, Elektro-enkefalográfia
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy, Elektrokémiai impedancia spektroszkópia
EK MFA	Magyar Tudományos Akadémia Energetikai Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet
ELTE TTK	Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
FBR	Foreign Body Response, „Idegen test reakció”(vagyis az élő szervezet válasza idegen test jelenlétére)
FCS	Fetal Calf Serum, Borjú szérum
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid, Gamma-aminovajsav
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, Gliális fibrilláris savas fehérje
GFP	Green Fluorescent Protein, Zöld fluoreszcens fehérje
LPCVD	Low Pressure Chemical Vapor Deposition, Alacsony nyomású kémiai gőzfázisú leválasztás
MEMS	Micro-Electromechanical Systems, Mikro-elektromechanikus rendszerek
MTA	Magyar Tudományos Akadémia
MTT	4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule, Idegsejt adhéziós molekula
NE-4C	Patkány neuroektodermális sejtvonal
NG2 sejtek	Polidendrocita, idegi eredetű sejtípus, mely oligodendrocitává differenciálódik
P2X7	Purinoreceptor típus
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern, Patogén molekuláris mintázat
PB	Phosphate Buffer, Foszfát Puffer
PEDOT	poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate

PEG	Poly(ethylene glycol), Polietilén-glikol
PFA	Para-Formaldehid
PLL	Poly-L-Lysine
RA	Retinic Acid, Retinsav
RF	Radio Ferquency, Rádiófrekvencia
RMS	Root Mean Square, Négyzetes közép
ROI	Region Of Interest, Mérési tartomány
SNR	Signal to Noise Ratio, Jel/zaj viszony
TB	Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) Buffer
TBS	Tris Buffered Saline, Tris pufferelt sóoldat
TRP	Transient Receptor Potential, Tranziens receptorpotenciál
TTK KPI	Természettudományi Kutatóközpont Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet
UV	Ultra Violet, Ultraibolya fény

## 1. Bevezetés

### 1.1. Agyi potenciálok mérése

A központi idegrendszerben az idegsejtek egymással – bár a jelátvitel jelentős része kémiai ingerület átvitelrel zajlik – elektromos jelekkel kommunikálnak. Ezek a jelek megfelelő érzékelőkkel mérhetőek, melyek lehetővé teszik, hogy információt nyerjünk az agy működéséről fiziológiás és patológias körülmények közt [2]. Napjainkra ennek számos alkalmazása van mind a kutatásban, mind klinikai vonatkozásokban. Lehetőség nyílt az agy kapcsolatrendszerének feltérképezésére, és különböző, akár igen specifikus, magas szintű funkciók (például a memória) működésének akár sejtszintű megismerésére. A klinikumban különféle kórképek diagnózisára használható a nem invazív EEG (Electroencephalography, Elektro-encefalográfia) monitorozás, és a koponya alá ültetett elektródokkal akár egy epilepsziás góc helyzete is meghatározható [3].

A szövetbe ültethető elektródok fejlődésével lehetőség nyílt nemcsak a jelek monitorozására, de akár beavatkozásra is. A szövetbe bocsátott elektromos stimulusokkal mára több – farmakológiai kezelésre nem reagáló - kórkép (Parkinson kór [4], esszenciális tremor [5], distonia [1]) tüneti kezelése megoldható. Az úgynevezett mély agyi ingerlés (DBS, Deep Brain Stimulation) segítségével, jelentős életminőségbeli javulást biztosíthatunk a páciens számára.

Természetesen minden, az élő szövetbe kerülő anyag és eszköz esetében számos kritériumnak kell teljesülnie, melyek közül elsődleges, hogy az ne legyen az élő szervezet számára toxikus, és a lehető legkisebb mértékben károsítsa az egészséges szövetet. Ezen kívül azonban az agyi jeleket mérő beültethető eszközök tervezésénél számos további szempontt figyelembe kell venni. Attól függően, hogy milyen jeleket kell az eszközzel mérni, más-más lehet az eszköz mérete, az elektromos kontaktusok anyaga, mérete, száma és elhelyezkedése az eszközön. Ezek közül felhasználhatóság és biokompatibilitás szempontjából a mérettulajdonságok kulcsfontosságúak. Míg egy az agyfelszínre, a koponya alá elhelyezett eszköz esetében a méret kevésbé jelentős, addig egy, a szövetbe ültetett elektród esetén kiemelt fontossággal bír, mivel az eszköz mérete meghatározó az okozott szöveti sérülés mértékében [6]. Az eszköz mérete természetesen korlátozza a mérő, vagy ingerlő kontaktusok méretét is. Ezt azonban befolyásolja a felhasználás módja is. Mérőkontaktusok esetében a minél kisebb és minél több kontaktus jobb térbeli felbontást tesz lehetővé, egyúttal azonban a kontaktusméret csökkenésével nő a kontaktus impedanciája is, ami rontja a jel/zaj viszonyt. Ingerlő kontaktusok esetében az elektródméret csökkentését limitálja az elérni kívánt áramsűrűség, melynél az elektród anyagának töltésátadási képességén túl, a lehetséges szövetkárosodást is figyelembe kell venni. A szövetbe bejuttatott stimulus ugyanakkor kisebb kontaktus

használatával célzottabb lehet, aminek különös jelentősége van a mély agyi magvak ingerlésekor, ahol igen pontos lokalizációra van szükség.

A krónikus alkalmazás szempontjából további fontos szempont, hogy az eszköz és az implantáció körülményei milyen hosszú távú hatást váltanak ki a szövetben. Az eszköz beültetésére, ahogy bármilyen más sérülésre is, a szervezet egy összetett védekező reakcióval válaszol, melynek célja a sérült sejtek eliminálása, tovaterjedő károsodások megakadályozása, és az idegen test „kilökése”, elszeparálása a még ép szövegtől. A központi idegrendszerben ennek a folyamatnak jelentős része a reaktív gliózis [7], [8]. A végeredményben születő gliális hegyszövet nagy jelentőséggel bír a hosszú távú használhatóságot illetően, mivel elektromos szűrőként viselkedik [9]–[11].

Az agyszövetbe implantálható eszközök alkalmazásánál fontos figyelembe venni nemcsak az eszköz tulajdonságainak, méretének, alakjának, rugalmasságának, csúcstípusának a szöveti reakcióra gyakorolt hatását, hanem a beültetés helyének, módjának következményeit is [12]–[18]. Ezen az igen intenzíven kutatott területen számos eredmény született már arról, hogy miként befolyásolja a beültetés módja, sebessége, a műtét lefolyása (agyhártyák megnyitása), a krónikusan beültetett eszköz rögzítésének módja és a szöveti mikromozgások a sérülés mértékét [15], [19]–[21]. Kiemelt terület ezen belül is, hogy milyen hatással van a szövet roncsolódására, és ezáltal az eszköz funkcionalitására az implantáció során megsértett vérerekből származó vérzés [13], [22].

A gliareakció kialakulása, lefolyása és a fennmaradó glia heg problémája számos kérdést vet fel az eszköztervezők számára. Milyen lehetőségek vannak a gliareakcióba való beavatkozásra? Az eszköz felszínére kerülő, esetleg az eszközön keresztül bejuttatott kémiai anyagok milyen módon tudják befolyásolni az eszköz hosszú távú funkcionalitását, megbízhatóságát? Az implantátum fizikai tulajdonságai, anyaga, merevsége, alakja, topográfiája van-e befolyással a gliareakció lefolyására? Egyáltalán célravezető-e a szervezet védelmi reakciójának korlátozása, megakadályozása?

## **1.2. Célkitűzés**

Munkám során egy levilágító maszk használata nélküli mikrotechnológiai eljárással készülő nanostruktúrálási módszerrel, az úgynevezett fekete-szilícium módszerrel foglalkoztam, és annak az idegi implantátum felületére való integrálhatóságának lehetőségeit és a szövetre gyakorolt hatásait vizsgáltam *in vitro* és *in vivo* modellkörülmények közt. A munka hosszú távú célja, hogy olyan módosított felületű idegszövetbe ültethető eszközt készítsünk, mely segítségével lehetőség nyílna az agyi jelek jelenleginél hosszabb távú, megbízható monitorozására.



### **1.3. A központi idegrendszer végdifferenciált sejtjei**

#### **1.3.1. Neuronok**

A neuronok az idegrendszer ingerület-generáló és továbbító sejtjei. Méretük és morfológiájuk az agyban és az idegrendszer többi részén való elhelyezkedésüktől függően igen változatos. Számuk az idegrendszer egészét tekintve csupán 25%-ot tesz ki, mégis a fő idegrendszeri sejtek, mivel jelen ismereteink szerint ezek felelnek az idegi kommunikációért. Felépítésük sejttestből, számos dendritből, és általában egy hosszú, elágazó axonból áll [23]. A sejt többségében a sejttesten és dendritjein gyűjti össze a többi sejttől származó információkat, melyek hatására az axon eredésénél (axondomb) akciós potenciál generálódhat. Ez az ionáramokból adódó elektromos jel az axon hosszán végighaladva annak végén kémiai jelátviteli anyagok, neurotranszmitterek felszabadulását eredményezi, melyek információt közvetítenek a hálózatba kapcsolt idegsejteknek [23], [24]. A jelátvitel szinapszisokon át történik. Az úgynevezett preszinaptikus sejt az axonvégéből az akciós potenciál hatására felszabaduló, sejt típusra jellemző neurotranszmittereit a szinaptikus részbe üríti, ahol a posztzinaptikus sejt receptorai azokat érzékelik, és ennek megfelelő ionáramokat hoznak létre a posztzinaptikus sejt membránján. Egyetlen sejt több száz, több ezer posztzinapszisan érkeznek ilyen információk, ezek eredője által jöhet létre ezen a sejten is akciós potenciál, így továbbítódik az információ a következő sejtre [23].

Az elektródokkal ezek az elektromos jelek különféle módokon mérhetőek. A sejtközi, extracelluláris térben, esetleg az idegszövet, vagy akár a koponya felszínén számos sejt elektromos jelének összegzése, mint mezőpotenciál mérhető. Igen kis méretű elektróddal egy, vagy néhány sejt közelében akár az egysejt aktivitás is regisztrálható, és kapilláris mikroelektródokkal egyetlen sejten belüli potenciálváltozások is megfigyelhetőek [25].

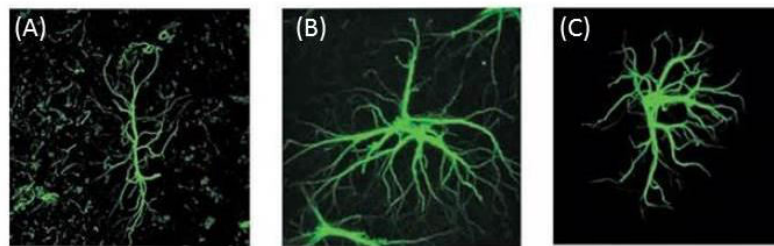
#### **1.3.2. Asztroglia sejtek**

Az asztroglia sejtek általános definiálása igen nehéz feladat, mivel az idegrendszerben sok, eltérő tulajdonsággal rendelkező sejtet sorolunk ez alá a gyűjtőfogalom alá. Egységes definiálását legjobb megközelítésben a következő kritériumok adják [26]:

- Elektromosan nem serkenthetőek, nem generálnak akciós potenciált
- Membránpotenciáljuk erősen negatív (-80- -90 mV)
- GABA (Gamma-Aminobutyric Acid, Gamma- aminovajsav) és glutamát transzportereket expresszálnak

- Nagyszámú intermedier filamentum köteget tartalmaznak, amelyek jellegzetes fehérje-komponense a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein)
- Glikogén granulátumokat tartalmaznak
- Az érközeli sejtek nyúlványai vérereket fonnak körbe és azokhoz kapcsolódnak
- Periszinaptikusan gazdag elágazódással rendelkeznek
- A többi asztrocitához réskapcsolatokkal kapcsolódnak (connexin 43 és/vagy 30 molekulákkal)

Az asztrocitáknak számtalan típusa létezik, melyek közül sok specifikusan egyes agyi régiókra jellemző (1. ábra). Ezért az eszköztervezés során, a pontos cél figyelembevételével érdemes dolgozni, ismelve a ritkábban előforduló, de lokális környezetükben nagy jelentőséggel bíró alkotóelemeket is [27].



**1. ábra** Különbéféle agyi területekről származó asztroglia sejtek, GFAP festéssel megjelenítve. (A) Entorhinális kéreg, (B) Hippokampusz, (C) Prefrontális kéreg [27]

Az asztroglia sejtek jellemzője, hogy réskapcsolatokon (gap junction) keresztül a sejtek „syncytiumot” alkotnak. Ez tulajdonképpen több sejtmagot tartalmazó sejtplazma egység, vagyis több gliasejt folytonos kapcsolata a réskapcsolatokon keresztül [28], [29]. A sejtek egymással  $Ca^{2+}$  és  $Na^+$  ionfluktuációkból adódó hullámokkal kommunikálnak [30], [31], melyek terjedését a réskapcsolatok teszik lehetővé.

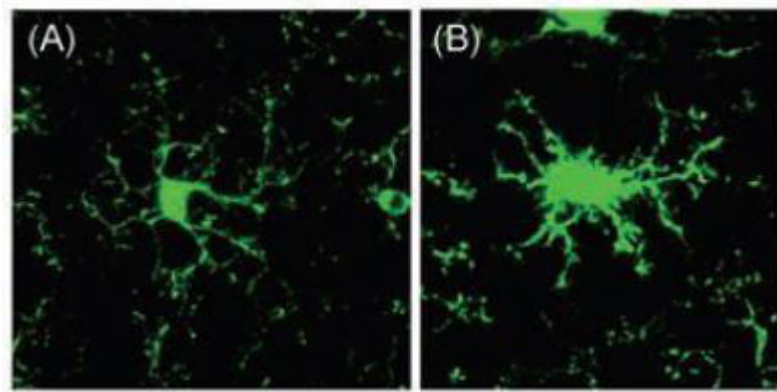
Az asztrociták minden általánosan előforduló ioncsatornát (feszültség független és –függő  $K^+$  csatorna, feszültség függő  $Na^+$  csatorna, TRP (Transient Receptor Potential) csatornák ( $Ca^{2+}$ ), különféle szabályzású anion csatornák) valamint aquaporinokat is kifejeznek [32], [33]. Azonban ezek közül van olyan, mely fiziológiás körülmények közt nem fordul elő ezekben a sejtekben, csupán egyes patológiás esetekben jellemző (pl. egyes feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák reaktív gliózis során [34], [35]) Nagyon érdekes, hogy több közülük tenyésztett asztrociták esetében szintén fellelhető, de *in vivo* funkcionális expressziójuk fiziológiás esetben jelen ismereteink szerint nem fordul elő [33], [34]. Ezek a sejtek nagymértékű plaszticitást mutatnak mind *in vitro*, mind *in vivo*. Képesek expresszálni az összes

neurotranszmitter receptorát (mind ionotróp, mint metabotróp receptorokat), melyet a neuronok is, és a lokális neurotranszmitter környezet szabályozza a receptorok expresszióját [36]–[38]. Szerepet játszanak a neurotranszmitter háztartásban, így többek között az adenzin extracelluláris koncentrációjának szabályozásában is. Az adenzin a szinaptikus jelátvitel általános szabályozója, illetve gyulladáscsökkentő hatással bír, valamint a központi idegrendszer gyulladáscsökkentő folyamataiban fontos szerepet játszó mikroglia sejtek mozgékonyágának egyik regulátora [39]. Ez a molekula a központi idegrendszerben a pusztuló sejtekből és reaktív asztrogliá sejtekből szabadul fel nagyobb mennyiségben [40]. Az asztrociták fontos szerepet játszanak az egészséges idegszövet glutamát anyagcseréjében is. A glutamát a leggyakoribb serkentő jelátvivő anyag a központi idegrendszerben, és felesleges jelenléte erősen neurotoxikus [41], [42].

Az asztrociták a központi idegrendszer fő homeosztatisztikus sejtjei. Részt vesznek az agyi mikrokeringés szabályozásában [43], az agyi energetikai folyamatokban [44], és a víz- és ionháztartás fenntartásában [45], [46]. Szerepük van a neurogenesisben, az idegrendszer, s a szinapszisok kifejlődésében [47] és azok szabályozásában [48], [49]. Strukturális, ion- és neurotranszmitter háztartás fenntartó funkciójuk van [50], [51]. Bár az agy fejlődése során axon növekedést serkentő hatásuk is van [52], a mikro- vagy makrosérülések hatására reaktívvá váló asztrociták akadályozzák az axon-növekedést, ami különös jelentőséggel bír, ugyanis az idegszövet sérülése nyomán kialakuló gliális hegyszövet a fő akadálya a későbbi axon regenerációnak [27].

### **1.3.3. Mikroglia sejtek**

A mikroglia sejtek a központi idegrendszer makrofágjai, és a szervrendszer védekező mechanizmusainak többségét biztosítják. Mezodermális eredetűek, és korai fejlődési szakaszban kerülnek a központi idegrendszerbe. A kifejlődött agyban, nyugalmi állapotukban, erősen nyúlványos morfológiát mutatnak. Mozgékony nyúlványokkal az agyszövet meghatározott, szigorúan territoriális területét monitorozzák, és patológiás esemény hatására aktiválódnak (2. ábra). Az aktív mikroglia amöboid formát ölt, és képes vándorlásra, osztódásra és fagocitózissra [27], [53]. Számuk az élőlény korával nő, valószínűleg osztódás miatt (a vér-agy gáton át nem vándorol be több mikroglia az agy kifejlődését követően).



**2. ábra Nyugalmi állapotban levő, nyúlványos morfológiájú (A) és aktivált, amöboid formát öltött (B) mikroglia sejtek.[27]**

Sejtkultúrában vizsgált mikroglia gyakorlatilag mindig aktivált állapotban van. Mivel ezek a sejtek, funkciójukból adódóan különösen érzékenyek a környezet változásaira, *in vitro* körülmények közt sosem viselkednek fizioiógias módon [27].

A mikroglia sejtek a legtöbb féle ioncsatornát expresszálják, melyeket az asztrociták és a neuronok is, és ezek kifejeződése aktivált állapotukban emelkedik [54]. Neurális környezetükhöz neurotransmitter receptorok expresszálásával alkalmazkodnak [55], [56]. Jellemzőek rájuk a purinoreceptorok, melyek szabályozzák a sejt motilitását, nyúlvány növekedését, és gyulladáskeltő faktorok felszabadítását, valamint a  $Ca^{2+}$  jeladást. A  $P2X_7$  purinoreceptor a szervezet általános immunsejt-jellemző receptora, szintén megtalálható a mikroglia sejtek felszínén. E receptor aktiválódásához magas ATP szintre van szükség, ami miatt megfelelő jelzője a környező sejtpusztulásnak. Ezek a receptorok, kiemelkedő funkciójukként a mikroglia aktiválást szabályozzák, és a sejthalál általános szabályozói is [57]. A citokin és kemokin receptorok a mikroglialis motilitást és kemotaxist szabályozzák, és befolyásolhatják különféle gyulladáskeltő faktorok felszabadítását [55], [58]. A mikroglialis receptorok egy fontos fajtája a patológiás mintázatokat felismerő receptorcsalád (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns), melyek a mikroglialis aktivációt szabályozzák több féle intracelluláris jelátviteli útvonalon keresztül. A mikroglialis funkciók szempontjából különösen fontosak a Toll-like típusú receptorok, melyek közvetlenül befolyásolják a mikroglia aktivációt számos neuropatológiás helyzetben [59]. Hasonlóan az előzőekhez, e receptorok kifejeződése is megnő a sejtek aktivált formájában. Mindezekon kívül sok más olyan receptor-rendszer is expresszálják ezek a sejtek, melyek segítenek a monitorozó funkció végrehajtásában. Ezek akkor aktiválódnak, amikor a vér-agy gát megsérül, ezért különös jelenőségük lehet a gliózisban [27].

## 1.4. Reaktív gliózis

### 1.4.1. A gliózis fogalma

A reaktív gliózis az idegrendszer különféle típusú sérüléseire adott többlépcsős, evolúciósan konzervált védekező válasz. Fontos szerepet játszanak benne az asztrociták különféle funkcionális rendszerei, és a mikroglia sejtek, mint az idegrendszer károsodást érzékelő sejtjei [60]–[62]. A gliózis „célja” a károsodott szövet egészségestől való elszigetelése, a sérült vér-agy gát helyreállítása és a sérülés utáni neurális kapcsolatrendszer visszaállítása, újrakepzésének megkönnyítése [27], [62].

A folyamat csoportosítható morfológiai megjelenés vagy súlyosság alapján. Morfológia alapján két csoportra osztható. Izomorf gliózisban a gliasejtek megnőnek, és emelkedik a GFAP és vimentin expressziójuk, de nem változtatják meg a szöveti elrendezést, és nem bontják meg az asztrogliális territoriális elrendeződést. Támogatják az axonnövekedést és a szinapszisképzést, tehát segítik a neuronhálózat újrakialakítását. A sérüléstől távolabb jellemző ez a morfológia. Anizomorf morfológia esetén a nagymértékű sejtnövekedés, GFAP és vimentin szint emelkedés mellett a sejtek elkezdnek osztódni, és megszűnik a territoriális elrendeződés. A sejtek olyan faktorokat expresszálnak (chondroitin és kreatin), melyek gátolják az axonnövekedést, hogy ezzel megakadályozzák a nyúlványok sérült területre történő bejutását. A folyamat végére a szövet teljesen átrendeződik és tartós gliális hegszövet alakul ki. [27], [63]

Súlyosság alapján megkülönböztethetünk enyhe és közepes, és erős (diffúz) asztrogliózist. Az enyhe és közepes súlyosságú gliózis jellemzői gyakorlatilag az izomorf formával egyező jelek. Ez enyhe trauma esetében, pl. általános immunválasz (vírusok, baktériumok) esetén, a sérüléstől távolabb fordul elő. A veszély megszűnése után a sejtek visszatérnek normális morfológiájukhoz és funkciójukhoz. Az erős/ diffúz asztrogliózis szintén sejtnövekedéssel és bizonyos fehérjék koncentrációjának növekedésével kezdődik, és megszűnik az asztrogliális sejtek territoriális elrendeződése. Az eredménye a szövet hosszú távú átrendeződése, mely diffúzan kiterjedhet távolabbi régiókba is. A szöveti változás gyakorlatilag végleges. Erős fokális sérülés és krónikus neurodegeneratív területek vagy fertőzés környékén alakul ki ez a válasz. Igen súlyos esetben jelentkezik a gliális hegszövet kialakulása. Szintén sejtnövekedéssel, GFAP és vimentin expresszió növekedéssel, osztódással jár. Ekkor a sejtek fiziológiai elrendeződése megszűnik, és azok kompakt határvonalat képeznek a sérült, fertőzött, neurodegeneratív terület körül. A hegszövet kialakításában részt vesznek az aktivált mikroglia sejtek, NG2 sejtek és fibromeningeális sejtek. Ezek olyan extracelluláris mátrix faktorokat választanak ki, melyek gátolják az axonnövekedést. A kialakult hegszövet végleges. [60], [63]

A reaktív gliózis beindító faktorok a sérült sejtekből vagy sérült vér-agy gát felől érkeznek. Lehetnek neurotranszmitterek (ATP, glutamát) citokinek, adhéziós molekulák, növekedési faktorok, vér elemek, és relatív koncentrációjuk határozza meg a gliareakció típusát. Annak folyamata, ahogy a fiziológias asztrocitákból reaktív glia sejtek lesznek, pontosan nem ismert. Lehetséges, hogy az aktivált sejtek asztroglialis prekursorokból születnek, de az is lehet, hogy főleg a plazmás asztrocitákból származnak [27].

### **1.4.2. A gliózis lefolyása**

A gliózis lefolyásának különféle fázisai határozhatók meg attól függően, hogy milyen folyamatok dominálnak. Meg kell azonban jegyezni, hogy a szakaszok közt nincs éles határvonal, egymással részben párhuzamosan zajlanak, és egymásra jelentős hatással is vannak [64]–[66].

#### **Gyulladásos fázis**

A sérülést követően először, nagyjából két nap időtartamig, a mikroglia sejtek jutnak jelentős szerephez. Mint a központi idegrendszer makrofágjai, a szervezet bármely más területén bekövetkező sérülésre adott makrofág reakcióhoz hasonló funkcióval bírnak. A szövetsérülést számos olyan anyag felszabadulása követi, melyek elsősorban a mikroglia sejteket aktiválják [67]. Az aktiválódás hatására a mikrogliaiban expresszálódnak a makrofág-markerek, és számos olyan faktort termelnek, melyek fokozzák a gyulladásos állapotot. Citotoxikus hatásúak és aktiválják az asztroglia sejteket, vannak azonban köztük neuroprotektív hatású anyagok is. [65]

A mikroglia sejtek fagocitáló alakot vesznek fel (aktivált mikroglia), és eltávolítják a sérült szövetdarabokat, és a véralvadékat. Különösen nyílt sérülés esetén - és az implantáció ilyen – megkezdik a védőreakciót, és számos olyan faktort választanak ki, mely a szervezet többi részén is a gyulladásos folyamatokra jellemző. Az idegszövet fokális sérülése esetében azonban ezek többsége felelős az asztroglia aktiválódásáért [67]. Jelenleg nem ismert pontosan, hogy van-e a különféle sejtípusok aktiválódásának pontos üteme, de az világos, hogy a végbemenő folyamatok egymásra erősen hatnak, és a védekező reakció inicializációjakor általában egymást erősítik. Az aktivált asztroglia sejtek által kiválasztott faktorok a mikroglia aktivációt is tovább serkentik. [68], [69]

A gyulladásos fázis része, és következménye az úgynevezett másodlagos neuronkárosodás. A sérülés periferiáján még egészséges neuronok is áldozatául esnek a gyulladásos reakció következtében kialakuló kedvezőtlen molekuláris környezetnek [70].

### **Asztroglíózis**

A sérülést követő 3-14. napon az aktivált asztroglia sejtek jellegzetes morfológiai változásokon mennek keresztül. A GFAP mennyisége és immunoreaktivitása nő, és a sérüléshez közeli nyúlványokban kimutatható a nesztin és vimentin jelenléte. Először az úgynevezett anizomorf fázis figyelhető meg, mely esetében a nyúlványok fejlődésének nincs kiterjedt iránya. Ezt követi az izomorf fázis, mely során a sérüléshez közel elhelyezkedő asztroglia nyúlványok a sérülés irányába megnyúlnak, ezáltal képesek a sérülés területét az egészséges szövetből elszeparálni. A sérülés közvetlen közelében megfigyelhető anizomorf gliareakció mellett az agynak akár távolabbi területein (akár az ellenoldali agyfélteke megfelelő területén) enyhébb, izomorf reakció is előfordul, mely valószínűleg neuroprotektív hatású [65].

### **Glia heg kialakulása**

Az izomorf fázis vezet a gliareakció harmadik fázisáig, mely eredménye, a glia heg valószínűleg végleges, vagy legalábbis igen hosszú távú változás az agyszövetben. A heg szövet kialakulásának első lépései már az első napokban megkezdődnek, először egy fibroblasztokból álló mag jelenik meg a sérülés körül, melyre válaszként az asztroglia sejtek laminint, és kollagént termelnek. A sérüléshez közel található asztroglia végtagjai ehhez kapcsolódnak, és ezzel kialakítanak egy a bazális membránhoz hasonló határreteget. [65]

Természetesen nem minden központi idegrendszeri sérülés esetén marad vissza glia heg, ez főleg a „nyílt”, vér-agy gátat jelentősen károsító sérülésekre jellemző. A dolgozatban szereplő implantációt, mint szűrt sérülést követően a fenti jellemzőkkel írható le az agy védelmi válaszreakciója.

Reaktív gliózis során az asztroglia sejtek normális háztartást fenntartó rendszereinek működései is részt vesznek a patológiás mintázatok kialakításában. A vízháztartásért felelős aquaporinok az ödémáért, a  $K^+$  csatornák az extracelluláris  $K^+$  ion felgyülemelésért, a connexinek a sejthalálra utasító jel terjedéséért felelősek [71]. Általánosan elmondható, hogy a reaktív asztrociták gliális prekursorokhoz hasonló tulajdonságokat is mutatnak, és azokra jellemző fehérjéket expresszálnak [62]. Vitatott azonban, hogy a gliareakcióban résztvevő reaktív asztroglia honnan származnak. Legvalószínűbb, hogy a rezidens gliapopuláció adja a reaktív glia nagy részét, a benne végbemenő főleg, de nem kizárólag citoskeletális változások nyomán. Azonban kimutatták, hogy az asztroglia sejtek egy része ismét osztódó alakot vesz fel, és így a reaktív sejtek egy része proliferáció útján jön létre [72], [73]. Ugyanakkor mutatnak jeleket arra is, hogy a kifejlett agyban, a szubventrikuláris zónában jelenlevő őssejtek, melyek képesek megfelelő környezeti hatásra mind neuronális, mind gliális irányba fejlődni, a sérülés hatására asztroglivá differenciálódhatnak [74], [75].

A kiterjedt, harmadik, hegeképző fázisig eljutott gliareakciót követően a sérült agyszövet lokális regenerációja gátolt. Bár a sérülés környezetében túlélő idegsejteken megjelennek az axonnövekedési kúpok, a növekedés a glia heg mentén „megtorpan”.

### 1.5. Idegi őssejtek szerepe gliózisban és a regenerációban

Napjainkban ismert tény, hogy a felnőtt agyban is találhatóak őssejtek, melyek az úgynevezett másodlagos germinatív zónákból származnak, és különböző fejlődési állapotokban az agyi parenchima sok pontján helyezkednek el. Ezek az idegrendszer több sejtípusává képesek differenciálódni [76]. Egyes funkcióik mára jól ismertek. Egy részükből a szaglópórába vándorló újabb és újabb idegsejtek születnek az egyed teljes élete során, mások pedig differenciálódva a hippocampusban szemcsesejtként funkcionálnak [77], [78].

Megfigyelték a kifejlett emlős agy többi részén is új neuronok beépülését, mely folyamat indikációjáról, lefolyásáról, és funkciójáról keveset tudunk. Arra is mutatnak jelek, hogy az agykéreg teljes területén helyezkednek el úgynevezett nyugvó őssejtek, melyek funkciója máig ismeretlen [79]. *In vitro* kísérleti körülmények közt belátható, hogy ezek a sejtek a megfelelő környezeti hatások és jelek mellett képesek mind neuronokká, mind asztroglia sejtekké fejlődni [79]–[81]. Egyes feltételezések szerint a gliózis során megjelenő megnövekedett GFAP pozitivitás részben az így keletkezett új gliasejteknek köszönhető [74]. Ezen asztroglia sejtek, és a másodlagos germinatív zónában található idegi őssejtek nagy valószínűséggel jelen vannak és szerepet vállalnak a reaktív gliózis lefolyásában. Így az is elképzelhető, hogy ezek a sejtek, tekintve, hogy képesek neuronokká differenciálódni [82]–[84], részt tudnak venni a sérülést követő idegi regenerációban új interneuronokká differenciálódva, ezzel segítve a sérült agyi hálózatok helyreállítását. *In vitro* körülmények közt vizsgálható, hogy milyen fizikai és kémiai körülmények szükségesek e sejtek neuronná történő fejlődéséhez, azonban nem tudjuk, hogy az élő szövetben megtörténik-e ez a folyamat, és ha igen, milyen módon. Azonban, ha előállítható olyan mesterséges környezet, melyben az idegi őssejtek nagy valószínűséggel idegsejtté differenciálódnak, és az erre alkalmas körülmények (fizikai, morfológiai és kémiai feltételek), a sérült szövetben is megvalósíthatóak, az segítségére lehet az idegszövet regenerációjának.

### 1.6. Biokompatibilitás

A sejtek természetes környezetükben a nanométer mérettartományba eső felületekkel, az extracelluláris mátrix (ECM, Extracellular Matrix) alkotóelemeivel, illetve más sejtek felszínének fehérjéivel érintkeznek [85]. Funkciójuk szempontjából kulcsfontosságú, hogy a



sejtek milyen módon kapcsolódnak, tapadnak egymáshoz és az ECM-hez. Az ECM struktúrái befolyásolják a sejtek alakját, és lehetővé teszik a sejtek migrációját [86]. Különböző patológias esetekben (például rákos sejtek környezetében) az ECM átrendeződik, és ezzel befolyásolja a környező sejtek működését [87]. Amikor a szövetbe idegen testet, implantátumot ültetünk, az a cél, hogy az eszköz minél inkább „észrevétlen” maradjon a szövet számára, és minél inkább olyan jeleket vizsgálhassunk, melyek az intakt szövetre, sejtekre jellemzők. Ez az eszközzel szemben támasztott igény a biokompatibilitás. Számos olyan megfontolandó tulajdonsága van a sejtek természetes környezetének, amelyek felhasználhatóak lehetnek egy biokompatibilis eszköz fejlesztésében.

Ismert, hogy a sejtek viselkedésére az élő szöveten belül számos kémiai faktor hat. Ezek részben a szomszédos sejtek felszínén található fehérjék, részben a sejt közötti térbe kiválasztott molekulák, melyek a sejteken belül különböző jelátviteli útvonalakon keresztül hatnak a sejtek génkifejeződésére, fehérjetermelésre, viselkedésére [88]–[91]. A teljes rendszer pontos feltérképezése a benne résztvevő molekulák nagy száma és az alkotóelemek egymással számos ponton kölcsönhatásba lépő jelátviteli útvonalai miatt azonban igen nehézkes. Az esetek többségében a mind időben, mind térben távolabbi következmények nem beláthatók (gondoljunk csak a gyógyszerekre, és azok minden esetben létező mellékhatásaira). Számos újabb eredmény mutat azonban arra, hogy a szöveti környezet fizikai tulajdonságai, felületi motívumai, érdessége, szabályos és szabálytalan mintázatai, rugalmassága szintén nagy jelentőséggel bírnak [92]–[96]. Történtek *in vitro* vizsgálatok arra nézve, hogy hogyan befolyásolja a „szilárd környezet” topográfiája a sejtek tapadását, mozgását, vándorlását és a differenciálódást [97]. E felületi tulajdonságok, és egyes sejtípusokra gyakorolt hatásuk megismerése ezért hasznos eszköz lehet az implantátumok tervezőinek kezében.

A fog, ízületi és egyéb csontprotézisek esetében évtizedek óta intenzíven kutatott terület a szöveti integráció és a funkcionalitás hosszú távú megbízhatóságának javítása az implantátumok felületi érdességének módosításával [95], [98]–[100]. Arra is fény derült, hogy a különböző sejtípusok *in vitro* másként reagálnak különböző érdességű felületekre [101]–[106], azonban csupán az utóbbi két évtizedben került ez a megközelítés előtérbe az agyi implantátumok esetében is.

Turner és munkatársai 1997-ben publikálták első eredményeiket agyi eredetű sejtek és nanostrukturált felületek kölcsönhatásáról [107]. Méréseikben immortalizált és primer asztroglia sejtek felületpreferenciáját, tapadását vizsgálták, és a két különböző sejtípust vizsgálva eltérő eredményre jutottak. A kísérletben felhasznált immortalizált sejt vonal (LRM55) egy patkány központi idegrendszeri tumor sejt, mely a rákos mutáció következtében korlátlan osztódásra képes. Ezáltal a sejtekből készített tenyészet hosszú ideig változatlan formában fenntartható [107]. Míg az egészséges, élő szövetből kinyert primer asztroglia sejtek

a nanostrukturált felületet preferálták, az immortalizált sejtvonal sejteiből a referencia felületen tapadt meg több. Ez egyszerre rávilágít arra is, hogy szöveti hatások modellezésére használt különféle *in vitro* eszközök esetében nagy jelentősége van az egyes modellezési szintek korlátjainak, melyeket a következtetések megállapításakor fontos figyelembe venni.

Mivel a szilícium az agyi implantátumfejlesztésben az egyik leggyakrabban használt alapanyag, számos kísérlet foglalkozik pórusos szilícium felületek vizsgálatával, illetve Si felületek különféle felületi módosításával. Bayliss és munkatársai pórusos és polírozott Si felületen vizsgálták B50 patkány neurális sejtek viselkedését [108]. Bár a sejtek a pórusos felületet kedvelték a legjobban, és azon osztódtak is, a morfológiájuk az egészséges sejtekéhez képest megváltozott. AMP Turner mart felületű szilíciumon tenyésztett immortalizált asztroglia sejtek vizsgálata során megállapította, hogy a különféle felületeken a sejtek fehérje-expressziós mintázata megváltozik [109]. Fan és munkatársai a Substantia Nigrából származó primer neuronokat vizsgálták HF marással készült különböző felületi érdességű és polírozott felületű szilíciumon. Eredményeik alapján szignifikánsan több sejt tapadt az érdes felülethez, mint a polírozott referenciához [110]. Egy következő munkájukban azt is megállapították, hogy e sejtípus számára mi az optimális felületi érdesség tartomány [111]. Azt is megfigyelték, hogy a tenyészetben élő sejtek 5 nap leforgása alatt a síkról a strukturált felületre vándoroltak [111].

Moxon és munkatársai 2004-ben publikálták a pórusos Si-t használó vizsgálataik eredményét, melyben nemcsak azt vizsgálták, hogy sejtenyészetben hogyan viselkednek a patkány asztroglialis és PC12 neuronális eredetű sejtek, de készítettek módosított felületű, platínával bevont pórusos Si alapú elvezető pontokat tartalmazó implantátumot is, melyet egy hét beültetés során vizsgáltak patkány agykérgében [112]. Az *in vitro* vizsgálatok során, a pórusos felületen fokozott neurit növekedést figyeltek meg a referenciához képest. A beültetett eszköz esetében egy hét után sem láttak változást a regisztrált akciós potenciálok számában a módosított, és a referencia kontaktusfelületek közt. Meg kell jegyezni, hogy a nanométer mérettartományú pórusos felületre leválasztott platina planarizáló hatását nem vizsgálták, és az egy hetes implantációs idő az irodalom alapján nem elég a glia heg kialakulására [65], így ilyen időtartam alatt a gliózisra gyakorolt esetleges módosító hatás nem minden aspektusa vizsgálható. Ebben a kísérletsorozatban nem vizsgálták továbbá az implantáció után a szöveteket sem.

Szintén kémiai marással strukturált szilíciumfelületeket vizsgáltak Khan és munkatársai 2005-ben, melyeknek más-más volt a felületi érdessége, és primer kortikális patkány idegsejteket tenyésztettek rajtuk [113]. Megállapították, hogy e sejtípus számára a 20 nm és 64 nm tartomány közti felületi motívumok szolgálnak jó szubsztrátként, sejtadhézió és

nyúlványnövekedés szempontjából. Sapelkin és munkatársai szintén a neurális sejtek nanostrukturált felület felé mutató preferenciáját állapították meg B50 sejtek szilícium felületeken történő vizsgálata során [114].

A gallium-foszfid, szintén több csoport által használt potenciális elektródfelület módosító alapanyag, mely *in vitro* vizsgálatára több példát is találunk az irodalomban [115], [116], vagy ritkábban *in vivo* mérésekben [117].

Amellett, hogy jelenleg csekély mennyiségű *in vivo* adat áll a rendelkezésre, ezek közül is csupán néhány foglalkozik a beültetés krónikus hatásaival.

Moxon és csoportja *in vitro* munkájuk folytatásaként pórusos Si felületű implantátumot teszteltek *in vivo*, patkány agykéregben [118]. Egy héttel az eszközök beültetését követően az eszköz polírozott és pórusos oldala közt vizsgálták a különbséget a szöveti reakcióban fluoreszcens GFAP festéssel. Eredményeik alapján a pórusos Si alkalmazása ígéretes lehet, meg kell azonban jegyezni, hogy a felhasznált felület pórusmérete inkább a mikronos tartományba esett, továbbá az egy hetes implantációs idő alatt az irodalmi adatok alapján a gliózis csupán a kezdeti szakaszában tart, a glia heg kialakulása ez alatt nem vizsgálható [65].

Kozai és munkatársai 2015-ben publikálták igen ígéretes eredményeiket poli(3,4-etiléndioxithofén) (PEDOT) alapú, szén nanocsövekkel módosított kontaktusú eszközükről, mellyel 4 hónapon keresztül mértek sejtaktivitást egér vizuális kérgében [119]. A 18  $\mu\text{m}$  átmérőjű kontaktusok impedanciája az első 3 hónapon keresztül jelentős mértékben nőtt, ezt követően stagnált, azonban még ekkor is képesek voltak megfelelő minőségű jeleket regisztrálni az eszközzel.

Nanostrukturált felületek felhasználásán kívül természetesen számos más próbálkozás is történt a gliózis mértékének csökkentésére, agyi potenciálok hosszú távú monitorozására.

Ezek közül a legtöbb valamilyen elektromos vezető polimert (polipirrolt [120], [121], vagy PEDOT-ot [121]–[123]), bioaktív bevonatot [124]–[127], esetleg a kettő kombinációját [128]–[130] használja fel az elektród kontaktusfelületén. A bioaktív bevonatok célja általában az, hogy az idegsejtek jobban növekedjenek, tapadjanak a mesterséges felületen, mely neurális adhéziós fehérjék, molekulák [124], [127], laminin [126] vagy akár mesterséges fehérjék [128] felületi immobilizációjával érhető el. Biran és munkatársai asztroglia felületen történő manipulálásával hoztak létre rendezett monoreteget a sejtekből, és úgy találták, hogy a gliasejtekkel párhuzamosan növő axonok szignifikánsan hosszabbra nőttek [125]. Az idegszövetnek a beültetés során történő megsértésével keletkező vérzés igen jelentős forrása az eszköz funkcióvesztésének [13], [14]. Ennek megelőzése, csökkentése céljából is használható bioaktív bevonat [22]. Az implantációval párhuzamosan, vagy az implantátum felületén a szövetbe juttatott gyulladáscsökkentő hatású faktorok alkalmazása szintén hasznos

módszer lehet az eszköz hosszú távú funkcióképességének növelésében [22], [131], [132]. Az irodalomban megtalálható mérések közt vannak *in vitro* [120], [124], [125] és *in vivo* vizsgálatok [122], [123], [126], [127], [129] is, valamint olyan munkák, melyek ugyanazt a felületet, anyagot mind *in vitro* mind élő szöveti környezetben vizsgálták [128], [130].

A bioaktív bevonatok használatának általános hátránya, hogy az implantátum előkészítése igen körülményes és időigényes, mivel az eszközök egyedi kezelését igényli. A bevonattal ellátott eszközök ezután már csak speciális körülmények közt, és korlátozott ideig tárolhatók, mivel ezek a bevonatok a szövet takarítómechanizmusai által elbonthatók, ami korlátozza a hatás időtartamát [133], [134].

A vezető polimer elektrokémiai leválasztása, önmagában is jel/zaj viszony javító hatással lehet, mivel megnöveli a mérőkontaktus aktív felületének nagyságát. Azonban a kontaktusfelületek elektromosan vezető polimerrel történő módosítása elektrokémiai módszerekkel szintén eszközönként történik, így ebben az esetben sem küszöbölhető ki az implantátumok egyenként történő előkészítése.

Számos kutatási eredmény utal arra, hogy az elektród anyaga és annak merevsége is befolyással lehet a kialakuló idegentest reakció súlyosságára [135]. Ennek nyomán több csoport is vizsgálta a rigiditás szövetre gyakorolt hatását [136], [137]. Rávilágítottak arra is, hogy a rigiditást csökkenteni szándékozó bevonatok vastagságának is nagy jelentősége van. Olyan felület alkalmazásával, mely rugalmassága az agyszövetéhez közel esik, nagyrészt kivédhető az eszköz mikromozgásai által generált hegesedés, ez azonban jelentős eszközméretbeli növekedést okozhat, ami a beültetéskor nagyobb szövetkárosodással járhat [137].

Munkám során olyan nanostrukturált felületű implantátumanyagokat vizsgáltam, melyek elkészítése a szilícium alapú agyi elektródok MEMS gyártástechnológiájába illeszthető, így megvalósítható a szeletszintű elkészítésük. Az elkészült eszközökre vizsgálataink során nem kerültek további bevonatok, így tárolásuk hosszú ideig megvalósítható, és tiszta, pormentes környezetben kívül nem igényelnek további speciális tárolási körülményeket.

## 1.7. MEMS technológia

Az utóbbi évtizedekben az agyi elektródok gyártása tekintetében előtérbe került a mikrotechnológia eszköztárának alkalmazása. Ennek segítségével nagyszámú eszköz készíthető el párhuzamosan, nagy pontossággal. A szilícium, mint alapanyag nem toxikus és a felületi és tömbi mikromegmunkálási lehetőségeknek köszönhetően számos funkcionális struktúra kialakítható, integrálható az eszköz felületén, például elektródok, vezetékezés, akár

egyszerű integrált áramkörök, hatóanyag adagoló mikrofluidikai csatornák, vagy integrált optikai hullámvezetők is. Az eszközök technológiai gyártási sora kiforrott az évek során, a különböző funkcionális egységeket tartalmazó eszközök gyártását ezekkel az eszközökkel valósítjuk meg.

A szilícium alapú, MEMS eljárással készült eszközök mellett gyakran használt alapanyagok a szintén MEMS eljárással megmunkált különféle polimerek. A PDMS, SU8, poliimid, és polipirrol biokompatibilis polimerek, ezekből öntvényezéssel, és litográfias eljárásokkal szintén készíthetők idegszövetbe ültethető eszközök [138]–[140]. Ezek előnye, hogy a szilíciumnál lágyabbak, emiatt egyrészt kevésbé törékenyek, másrészt irodalmi adatok mutatnak arra, hogy a szöveti reakciók szempontjából kedvezőbb lehet a kevésbé merev alapanyagok használata [20], [138], [141]. Ezekből a szilíciumhoz képest vékonyabb implantátumok készíthetők, mely szintén a biokompatibilitásuk előnyére válhat [142]. A polimer alapú eszközökre történő különféle funkcionális elemek (hatóanyag adagolók, optikai szál) integrálása ma már szintén megvalósítható [143]–[146]. Hasonlóan a szilícium alapú eszközökhöz, itt is lehetőség van egyszerre nagyszámú eszköz párhuzamos előállítására, azonos körülmények között, jó reprodukálhatósággal. Az eszközök hátránya azonban szintén a lágyágukban rejlik. A néhány tíz mikron vastagságú lágy polimer eszközökkel az agyszövet mélyebb rétegeibe a pontos célzás nehézkes, általában szükség van hozzá kiegészítő célzó, vezető berendezésre, rétegre vagy eszközre [147]–[150]. Ez a fejlesztést, gyártást és használatot költségesebbé, és körülményesebbé teszi.

Szintén gyakori a szigetelt fémszál elektródok használata, melyekből igen kis méretben előállítható számos féle elektródkonfiguráció [151]–[154]. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy az ilyen eszközök használata kevésbé súlyos szöveti reakciót válthat ki, így hosszabb távon használhatóak megbízhatóan [151], továbbá jelentős előny, hogy az eszközök kis átmérőjük ellenére sem törékenyek. A kontaktuspontok 3D elrendezése is könnyebben megvalósítható így, ami segíti az egysejt aktivitás helyének meghatározását [155]. További előnyük, hogy fejlesztésük és készítésük egyedi igények esetén is jelentősen kevésbé költséges a MEMS technológiával készült eszközökhöz képest. Hátrányuk viszont, hogy az eszközök egyedi készítése miatt sorozatgyártásuk időigényes, és a pontosság kevésbé garantálható. Az eszközökre további funkcionális elemek integrálása jelentősen bonyolultabb, és mivel a hordozóanyag belsejébe történő elhelyezésük (eltemetett csatorna, vagy optikai szál) nem megvalósítható.

Az e munkában felhasznált szilícium minták alapvetően a MEMS gyártástechnológia felhasználásával készültek, ezt ismertetem röviden a következőkben, Madou összefoglaló műve alapján [156].

Az eszközkészítés első lépése a szilícium hordozó felületén kialakítandó vezeték- és kontaktushálózat, vagy más integrált elemek rajzolatának rétegenkénti megtervezése. Gyártástechnológiától függően különböző rétegek szolgálnak a fémmezések kialakításához, kontaktusok, („pad”-ek) definiálásához, vagy esetünkben a nanostrukturált felületek elhelyezkedésének meghatározásához. Ezen rétegek tervezésére a CleWin [157] szoftvert használtam. A mintázatok vékonyréteg leválasztási és fotolitográfias eljárások, továbbá marási lépések sorozataként képződnek le a szilícium hordozó felületére, létrehozva a kívánt felületi struktúrát.

### 1.7.1. Fotolitográfia

Fotolitográfia során a hordozóra felvitt fényérzékeny polimerben egy lépésben képezzük le az UV megvilágító forrás és a hordozó közé pozicionált, ún. fotomaszkon található – általunk tervezett – mintázatot. A fotomaszk egy plánparallel üveglemez, melyen gőzölt króm vékonyrétegben alakítható ki pl. lézeres maszkgenerátor felhasználásával a kívánt mintázat. A litográfias lépést a hordozó tisztítása és szárítása (dehidratáló hőkezelés) előzi meg. Ezután a fényérzékeny polimert (fotólakk oldatot) centrifugával (spin coating) terítik a mintára, általában 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ , vagy felhasználástól függő vastagságban, majd az oldószereket hőkezelő lépéssel (softbake) távolítják el. A lakknak kétféle típusát különböztetjük meg attól függően, hogy az UV expozíció miként hozza létre a kontrasztot a lakkban. A pozitív lakkok az exponálás hatására oldhatóvá válnak, vagyis ebben az esetben a felületen a maszk által fedett területek lesznek lakk-védelem alatt. Negatív lakk esetében éppen ellenkező a helyzet, a lakk UV expozíció hatására polimerizálódik, így a felület maszk által fedett része válik szabaddá a marási lépés számára az előhívást követően. A levilágítás történhet kontakt, proximity vagy projekciós illesztéssel. Több litográfias lépés esetében a fotomaszkok az első, szeleten kialakított mintázathoz pontosan illeszkedő, ún. illesztő ábrát tartalmaznak, melyet a maszkilllesztő berendezésben lehet pozicionálni. A fotomaszk csíkszélességének, a lakk felbontóképességének és a megvilágító fényforrás hullámhosszának, optikájának függvényében érhetők el akár szubmikronos rajzolatok is. Ezt követi az előhívás, azaz az exponált lakk szelektív kioldása, mely után a lakkal nem fedett helyeken marható a korábban leválasztott vékonyréteg vagy maga a szubsztrát.

A nanostrukturált mintáink tervezése során figyelembe kell vennünk a szárazmarási eljárások során kritikus mintatelítettséget, az ún. „loading” effektust is, mely azt jelenti, hogy a felület hány százalékát nem fedi le a maszkunk.

### 1.7.2. Vékonyrétegek kialakítása

A szilíciumhordozó felületén számos eljárással tudunk vékonyréteget kialakítani. A szilícium saját anyagából magas hőmérsékleten előálló szilícium-dioxid ( $\text{SiO}_2$ ) növeszthető. Az így keletkezett  $\text{SiO}_2$  eszközeinkben elektromos szigetelőként funkcionál.

Polikristályos szilícium (poliSi), illetve  $\text{SiN}_x$  a hordozó felületén történő kialakítására kémiai gőzfázisú leválasztással van lehetőség. Ennek során adott térfogatáramon a reakció-kamrába vezetett megfelelő elegyű gázok felületi adszorpciója és kémiai reakciói során képződik vékonyréteg. Gyakran történik az eljárás alacsony nyomáson (LPCVD = Low Pressure Chemical Vapor Deposition), ami jó lépcsőfedéstést és egyenletességet biztosít. E rétegek lehetnek strukturális elemek, dielektrikumok vagy feláldozható rétegek is. Esetünkben poliSi vékonyrétegből alakítjuk ki később a nanostrukturált felületet.

Fémrétegeket jellemzően gőzöléssel vagy porlasztással választjuk le a felületre. Munkám során a felületre gőzölt alumínium feláldozható réteggént szolgált pl. a „lift-off” (lásd. 1.7.3. fejezet) technika során. A felületre porlasztott platina vékonyrétegből alakítottuk ki a tesztminták kontaktusait.

### 1.7.3. Vezető mintázat kialakítása: lift-off technika

A minták felületén a porlasztott fémrétegek strukturált kialakítását úgynevezett lift-off technikával végeztük el. Ennek során a felület egészére egy úgynevezett feláldozandó segédreteg (esetünkben alumínium és fotoreziszt) kerül, melyet fotolitográfiával és nedves kémiai marással teszünk szabaddá a bevonni kívánt felületeken. Ezután a teljes felületen megtörténik a fém, (esetünkben platina) leválasztása, porlasztással. Ezt követően a feláldozandó segédreteg szelektív eltávolításával a felette található felesleges fémréteget „leemeljük”.

### 1.7.4. Felületi és tömbi mikromegmunkálás kémiai és fizikai marással

A szilícium szeleten a tömbi anyagot (tömbi mikromechanika) és a felületen található vékonyrétegeket (felületi mikromechanika) szelektíven általában valamilyen maszkoló segédreteg felhasználásával munkálhatjuk meg nedves kémiai (maró oldatokkal) vagy szárazmarási (maró gázokkal) eljárásokkal. A marás profilja, jellege szerint a marás lehet izotróp vagy anizotróp. Előbbi, ha a marási profil nem függ az orientációtól, vagyis a maró anyag oldalirányba, és vertikálisan egyenletesen mar, utóbbi, ha a marás irány szelektív. Munkám során szárazmarási eljárásokat használtunk a poliSi nanostrukturálására, ill. a chip kontúrok kialakítására.

A száraz vagy plazmamarások során csökkentett nyomáson, rádiófrekvenciás gerjesztéssel az eltávolítandó anyagnak megfelelően megválasztott gázelegyben plazmakisülést hozunk létre.

A plazmakisülés során a töltéssel bíró részecskék a változó tér irányának megfelelően gyorsulnak és a gáz egyéb alkotóival ütköznek, melyek eredményeként kémiaailag aktív, ún. gyökök és ionok keletkeznek. Ha sikerül olyan körülményeket beállítani, ahol a kémiaailag aktív részecskék élettartama elegendően nagy ahhoz, hogy a reakcióterben elhelyezett szelet felületére is nagy számban eljussanak, akkor létrejön a kívánt marás, feltéve, hogy a reakció terméke is gáz halmazállapotú és deszorbeálódik a felületről. A gyakorlatban halogén F, Cl, néha Br alapú plazmákat használnak. A marási profil izotróp, v. anizotróp jellegét a kémiai reagens minősége és az alkalmazott plazmamaró konfiguráció tulajdonságai határozzák meg. Általánosságban elmondható, hogy a marások többsége izotróp jellegű, de a szubsztrát megfelelő előfeszítésével az izotróp kémiai marás kombinálható egy irányított "porlasztással", így a fizikai-kémiai reakció különböző fokú anizotróp marási profilt eredményezhet (reaktív ionmarás). A nanostrukturált felület kialakításához felhasznált reaktív ionmarási műveletet a 3.1.1. fejezetben részletesen is ismertetem.

#### **1.7.5. Chipek kialakítása: fűrészelés vagy kontúrmarás**

Az elkészült szeleteket a felhasználásra kerülő minták, úgynevezett „chipek” formájától függően különböző módon kezeljük. Egyszerű négyzet, vagy téglalap alakú formák esetén a szelet megfelelő vonalak mentén gyémánttárcsával fűrészelhető, így előállítva a kívánt méretű mintákat.

Az agyi elektród gyártása során az eszköz kontúrja ennél bonyolultabb, így litográfiával kialakított kontúrvonalak mentén a teljes szelet átmarásával valósítható meg, úgynevezett Bosch eljárással [158] reaktív ionmaró kamrában. A Bosch eljárással nagy oldalarányú marások végezhetőek, vagyis megvalósítható egy teljes szelet keskeny sávban történő átmarása is. Ennek során marási és passziváló lépések váltakoznak.



## 2. Kísérleti módszerek

### 2.1. Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcencia jelensége során a fluorofór megfelelő hullámhosszú megvilágítás hatására nanoszekundumos időintervallumon belül rá jellemző hullámhosszú fényt bocsájt ki. Fluoreszcens tulajdonságú festékanyagokat sejtek adott alkotóelemeihez, fehérjéihez specifikusan kötve lehetőségünk nyílik megfelelő megvilágítás mellett a sejt egyes elemeinek részletes mikroszkópos vizsgálatára. A sejtalkotó elemek specifikus festésére az immuncitokémia módszereit használhatjuk, és fluoreszcens mikroszkóppal megfelelő hullámhosszú fényforrás és szűrőkészlet segítségével az emittált fény detektálható. Van lehetőség arra is, hogy géntechnológiai módszerekkel a sejt genetikai anyagába juttassanak bizonyos fluoreszcens fehérjéket (például az ún. zöld fluoreszcens fehérjét, GFP, Green Fluorescent Protein) expresszáló géneket. Egyes fluoreszcens anyagok a sejtek bizonyos részeihez kötődnek (pl. a DAPI a DNS bizonyos szakaszaihoz), mások különböző antitestekhez kötve megvásárolhatók. Egy preparátum egyes részei, például egy sejt vagy szövet különféle fehérjéi akár különböző fluorofórokkal is festhetők, és erre alkalmas mikroszkóppal, és szoftveres támogatással a különböző csatornákon mérhető fluoreszcens képek egymásra illeszthetők.

A munka során felhasznált fluoreszcens festékeket, és a rájuk jellemző gerjesztési és emissziós hullámhosszokat az 1. táblázat tartalmazza.

<b>Fluoreszcens festék</b>	<b>Gerjesztési hullámhossz</b>	<b>Emissziós hullámhossz</b>
<b>GFP</b>	480nm	510nm (zöld)
<b>DAPI és Bisbenzimidide</b>	360 nm	460nm (kék)
<b>Alexa Fluor 594</b>	590nm	620nm (vörös)
<b>Alexa Fluor 488</b>	490nm	525nm (zöld)
<b>Alexa Fluor 546</b>	556nm	573nm (narancs)

1. táblázat A munka során felhasznált fluoreszcens festékek gerjesztési és emissziós maximumai

Megjegyzés: az első sorban szereplő GFP a vizsgált NE-4C sejtek citoplazmájában szolubilis fehérjeként fejeződött ki, ebben az esetben nem volt szükség immuncitokémiai festésre.

## **2.2. Pásztázó elektronmikroszkópia**

A pásztázó elektronmikroszkópia során a minta felületét az eszköz egy fókuszált elektronnyalábbal tapogatja le, képet nyerve ezzel annak felületéről. A minta felületére eső elektronnyalábból visszaverődő, vagy az elektronsugár gerjesztő hatása miatt a mintából kibocsátott úgynevezett szekunder elektronok jele mérhető. A mintakamrában vákuumra van szükség, ami miatt a biológiai minták dehidratálása az előkészítés során kulcsfontosságú, valamint a nem vezető minták vezető réteggel (például vékony porlasztott fém vagy szén réteggel) történő bevonása szükséges. A felbontása a fénymikroszkópiánál jelentősen nagyobb, nanométeres nagyságrendbe esik.

## **2.3. Fotometriás mérések**

Kvantitatív biológiai mérések közt jelentős helyet foglalnak el a fotometriás elven működő sejtes esszék. A mérések során a tenyészetek szabvány tenyésztőlemezekbe, úgynevezett „plate” lyukaiba („well”) kerülnek, melyekből a vizsgálat jellegétől függően használható párhuzamosan 6, de akár 512 mérésre alkalmas darab is. A többlyukas tenyésztőlemezek egyes soraiban és oszlopaiban egyszerűen valósíthatóak meg azonos körülmények, vagy soronként, oszloponként fokozatosan változtathatók a paraméterek, a többi körülmény változtatása nélkül, mely lehetővé teszi változatos hatások szisztematikus vizsgálatát *in vitro*. A tenyésztőlemez lyukaiban található minták ezután úgynevezett plate-olvasó berendezésekkel vizsgálhatóak, melyek optikai elven működnek. Az alkalmazott esszétől függő hullámhosszú megvilágítást követően detektálható a tenyészeteken áteső fény optikai sűrűsége, vagy fluoreszcens festékek használata esetén az áteső vagy visszaverődő emittált fény intenzitása lyukanként. Az egyes mintákon mérhető jelek arányosak a lyukban található sejtek számával, vagy a köztük bizonyos tulajdonsággal bíró (például valamilyen antitesttel jelölt) sejtek számával, így a lemez egyes mintái közt jól összehasonlítható kvantitatív információ nyerhető a tenyészetek viselkedéséről.

## 2.4. Biológiai mérésekben használt modellezési szintek és vizsgálható tulajdonságok

A biológiai mérések tervezése során lehetőség nyílik arra, hogy különféle modelleket válasszunk a kísérletünkhöz. A kísérlettervezés során mérlegelni kell ezek költségeit, hatékonyságukat az adott vizsgálatot, célt illetően, és etikai szempontokat is. Természetesen a választáshoz, és az eredmények helyes interpretálásához ismerni kell az adott modell korlátait.

Az élő anyagon végezhető legegyszerűbb és legköltséghatékonyabb vizsgálatok az immortalizált sejteken végzett sejtes esszék. Az immortalizált sejtek gyakorlatilag korlátlan osztódási képességgel bírnak, ilyen tekintetben a rákos sejtekhez hasonlóak leginkább, sok közülük valóban rákos szövetből lett izolálva. A sejtvonalak forgalmazóktól megvásárolhatók, majd bizonyos, (általában igen magas) passzázs számig sejt-változás nélkül szaporíthatók. Legtöbbjük egyszerűen fenntartható, és a fel nem használt sejtek hosszú ideig tárolhatók fagyasztva, amit követően gyakorlatilag változatlan formában felhasználhatóak ismét. A hosszan szaporíthatóság előnye egyben a modell hátránya is. A tulajdonképpen rákos sejteknek természetesen több funkciója is különbözik a fiziológiástól, és több olyan eredmény is született már, mely rávilágít arra, hogy alapvető viselkedésükben, például felülethez való tapadási tulajdonságokban, különböznek a primer, vagyis élő szövetből frissen izolált sejtek viselkedésétől [107]. Természetesen az élő sejtek sok alapvető funkciója jó közelítéssel ugyanúgy működik bennük, mint a fiziológiás osztódási képességgel bíró sejtekben (továbbá rákos szövet modellezésére természetesen kitűnően használhatók). Ezért a költséghatékony, és egyszerű kezelhetőség miatt igen gyakori a felhasználásuk első modellezési szintként.

Az immortalizált sejtekhez hasonlóan viselkednek osztódás szempontjából a különféle összejt tenyészetek, és ezért rájuk a sokszori felhasználhatóság szintén igaz. Ezek azonban nehezebben hozzáférhetőek és költségesebbek, általában olyan kísérletekben használhatók csak fel, melyek kifejezetten összejt viselkedését vizsgálják, mivel adott sejttípussá történő differenciáltatásuk a tervezett mérés előtt igen jól kontrollált körülményeket és sok időt igényel.

Az élő szövetben található sejtek viselkedéséhez közelebb állnak a primer sejteket felhasználó modellek. A primer sejtek élőlények szervezetéből a kísérletek előtt izolált, a szövetből szelektált, és a sejttípusnak megfelelő körülmények közt fenntartott sejtek. Előállításuk időigényes és költségesebb, mint az immortalizált sejtvonalak használata, a sejtek izolálása, és szelektálása szakértelmet igényel. Sejttípustól függően korlátozott mértékben, vagy akár, például neuronok esetében, egyáltalán nem szaporíthatók, így újabb és újabb előállításuk szintén több költséget ró a felhasználóra, mint az immortalizált sejtek használata.

Előnyük viszont, hogy ha a kísérletnek megfelelően kiválasztott, egészséges élőlényből lettek izolálva, a sejtek sok lényeges - bár közel sem az összes – tulajdonságukban megegyeznek a fiziológiai környezetben találhatóakkal. Azonban a sejtek funkcióira fiziológiai körülmények közt számos, magukon a sejteken kívül álló dolog hat (más sejtekkel, sejtípusokkal történő interakció, extracelluláris mátrix összetétele és szerkezete), melyek egy sejttenyészetben nem, vagy csak részben reprodukálhatók. Az egyféle sejtípust tartalmazó tenyészetekben hiányoznak a különféle sejtek egymásra gyakorolt hatásai. Esetünkben, mint láttuk a sejtek leírásánál, fiziológiai környezetben a neuronok gliasejtek nélkül nem maradnának fenn. Természetesen létrehozható és bizonyos ideig fenntartható tiszta neuronális tenyészet, azonban az asztrogliá sejtek közreműködése híján funkciójában jelentősen különbözni fog a fiziológián megfigyelhető működéstől. Vannak olyan sejtípusok, melyek kifejezetten a környezet változására érzékenyek, így megfigyelések szerint tenyészetben soha nem viselkednek fiziológián (például nyugalmi állapotban levő mikroglia sejt tenyészetben nem figyelhető meg [27].)

A több sejtípust tartalmazó úgynevezett ko-kultúrák ebből a szempontból jobban modellezik a szövet működését. Azonban az élő szervezet működésében jelentős szerepe van a 3D elrendeződésnek, mely hatás tenyésztőlemezen, kétdimenziós tenyészetekben természetesen nem figyelhető meg [86].

Megoldást jelenthetnek erre az úgynevezett 3D tenyészetek, melyek bonyolult háromdimenziós szerkezetekkel próbálják modellezni a szövetek organizációját, úgy, hogy mesterséges „állványokon” (scaffold) tenyésztik a sejteket. Ezek rutinszerű használata azonban egyelőre ritka.

Vannak olyan mérések ugyanakkor, amelyek 2D tenyészetben olyan alapkutatói kérdésekre adhatnak választ, mint például a sejtek viselkedésére való következtetés a morfológia- vagy sejtszám-változás alapján. A fluoreszcens mikroszkóppal megjeleníthető sejtmagok és a citoskeleton elhelyezkedése, szerkezete, organizációja alapján, vagy akár a sejtfelszín elektronmikroszkópos vizsgálata alapján számos következtetés vonható le a sejtek állapotáról, életképességéről, tapadásáról, és akár a motilitásáról is. A sejtek a felszínhez úgynevezett fokális adhézios pontokban tapadnak, melyeket a citoskeleton rostjai stabilizálnak. Az adhézios pontokon ezért az aktin citoskeleton ellaposodása figyelhető meg mikroszkópos felvételeken. Mivel az erősen letapadt sejtben a sejtváz ennek megfelelően rendeződik, és ez hat a sejtmagra is, a jól tapadó sejtben a sejtmag ellaposodó, ovális alakú, és sima felszínű lesz [159]. A tapadás gyengülésével a sejtmag felszíne érdes lesz és térfogata csökken [160]. A programozott sejthalál esetén a sejtmag térfogata szintén csökken a kromatinállomány kondenzálódásával, és a sejtplazma tömörülése miatt az egész sejt térfogata csökken. Jellegzetes felszíni változás az úgynevezett hólyagosodás („blebbedés”) a sejtmembránon,

mely tulajdonképpen apoptotikus testek lefűződése, melyeket aztán a szövet megtisztításáért felelős környező sejtek fagocitálnak [161].

Sejtszámok különböző, jól kontrollálható körülmények közt történő kvantitatív meghatározására is jelentősen egyszerűbb és pontosabb lehetőségek állnak rendelkezésre *in vitro* modellek használatával, mint az élő szöveten belüli vizsgálatok esetén.

A fiziológias működéshez legközelebb természetesen az élő szövetben tett megfigyelések állnak. Ezek az élőlények fenntartása miatt igen költségesek lehetnek, és a kísérlet jellegétől függően több szakember tudását is igénylik. Lehetőség van élő szövet, szerv fixálást követő vizsgálatára. Ekkor megmarad a szövet anatómiai integritása, de a modell élettani folyamatok vizsgálatára – értelemszerűen – nem használható. Fixálás nélkül, ún. túlélő preparátumokon (pl. agyszleteken) vizsgálhatók szerv-élettani alapfolyamatok, és ez a modell a méréseket egyszerűbbé és kevésbé költségessé teszi az *in vivo* vizsgálatokhoz képest, azonban a szövetek élő szervezetben kívüli fenntartása csupán igen korlátozott ideig valósítható meg.

A szövetek működésének az élő szervezetben történő vizsgálata az *in vivo* vizsgálat. Ezzel a módszerrel jó közelítéssel valóban a fiziológias vagy kiválasztott patológias körülményekről nyerhető információ. A kísérletek végrehajtásához általában műtétre van szükség, mely igen bonyolulttá és költségessé teszi ezeket a méréseket. Számolni kell az élő állatok fenntartásának költségeivel, etikai és engedélyeztetési kérdésekkel is. Élőlényben történő mérések esetében lehetőség nyílik hosszú távú hatások vizsgálatára, mely alapulhat akár az állat viselkedésének megfigyelésén, akár a vizsgálati idő letelte után a szövetek fixálást követő vizsgálatán. Ekkor lehetőség van a szövet egyes sejtjeinek specifikus festésére, így a sejtek vagy bizonyos fehérjék, markerek előfordulásának meghatározására. Ehhez általában a szövet festése után mikroszkópos mérések szükségesek. Amennyiben kvantitatív információt szeretnénk nyerni a markerek mennyiségéről, esetleg sejtszámokról, bonyolult, és általában specifikusan az adott kísérlethez fejlesztett képfeldolgozási lépések szükségesek, melyek a kiértékelést jelentősen összetettebbé teszik, mint például a fotometriás mérések alkalmazása esetében.

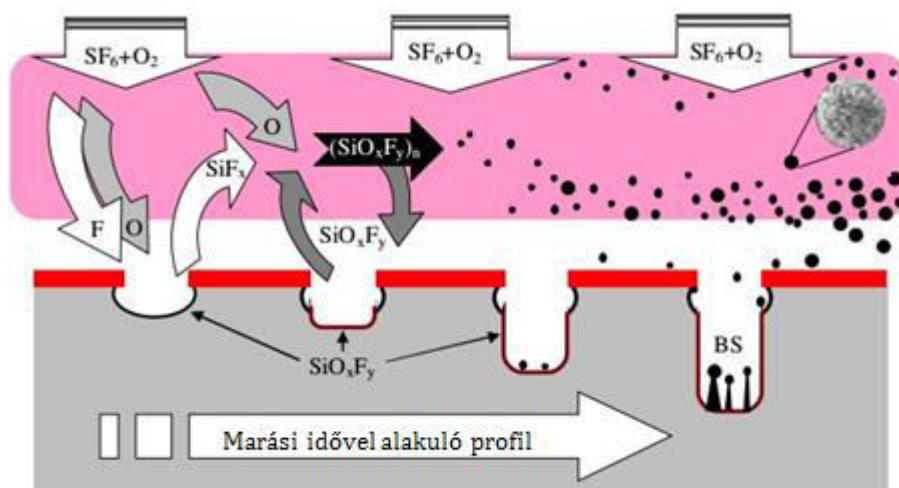
Még *in vivo* mérések esetén is számolni kell a választott állatmodell korlátaival. Az evolúciósan erősen konzervált folyamatok megfigyelésére alacsonyabb rendű élőlények használata is elegendő lehet, míg természetesen vannak olyan vizsgálatok, melyek eredményeinek humán alkalmazásra történő interpretációja akár főemlősökkel végzett kísérleteket is igényel. Ezek komoly etikai kérdéseket támasztanak, és igen jelentős mértékben növelik a költségeket. A gliózis evolúciósan erősen konzervált védekező mechanizmusa a központi idegrendszernek [27], Kísérleteinkben alacsonyabb rendű élőlények sejtjeit, agyszövetét használtuk a modellezésére.

### 3. Alkalmazott mérési eljárások

#### 3.1. A fekete szilícium nanostruktúrák készítése és vizsgálata

##### 3.1.1. Nanostrukturálási eljárás mechanizmusa

A vizsgálataink során alkalmazott nanostrukturálási eljárás fizikai marással, mély reaktív ionmarással (DRIE = Deep Reactive Ion Etching) végezhető el, alacsony hőfokon ( $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [162]. Nem szükséges hozzá maszk alkalmazása, a kapott struktúrák kúp-szerűek, és a felületen random helyezkednek el. A marás  $\text{SF}_6/\text{O}_2/\text{CHF}_3$  plazmában történik. Az  $\text{SF}_6$  gázból  $\text{F}^-$  gyökök kerülnek a plazmatérbe, melyek a Si kémiai marásáért felelősek, és a Si rezidumokkal  $\text{SiF}_4$ -et képeznek. Az  $\text{O}_2$ -ből képződő  $\text{O}^-$  ionok járulnak hozzá a  $\text{SiO}_x\text{F}_y$  passzíváló anyag kialakulásához, mely akadályozza a Si felület marását. A  $\text{CHF}_3$ -ből képződő  $\text{CF}_x^+$  ionok ezt a passzíváló réteget irányítottan marják, és végeredményben  $\text{CO}_x\text{F}_y$  képződik. A gázok térfogatáramának, az ionok gyorsulásáért felelős rádiófrekvenciás előfeszítésnek, és a marás számos egyéb körülményének módosításával szabályozható a marási profil. A paraméterek egy megfelelő kombinációjával elérhető a függőleges oldalfalmarás, melynek egy mellékterméke a képződő „fekete szilícium fű”. Ilyenkor a marás során úgynevezett mikromaszkok képződnek, melyek a nem vertikális oldalfal marás esetén alámaródnak, és rövid időn belül eltűnnek. Amikor azonban az oldalfal- marás profilja függőleges, a mikromaszkok alatt a Si nem maródik el, így képződnek a kúp alakú struktúrák (3. ábra) [163]. Az 1. ábrán a folyamat sematikus ábrázolása látható. A gázelegy összetétel arányának, a térfogatáramoknak, a hőmérséklet értékeknek, és a felület lefedettségének változtatásával a képződő oszlopok morfológiájának változását vizsgáltuk.



3. ábra Fekete szilícium nanostruktúra képződés mechanizmusának sematikus rajza [162].

A bemutatott nanostrukturálási módszer előnye, hogy teljes szilícium szeleten, így számos eszközön egyszerre végrehajtható, és hogy az elektródok gyártási sorába ez a lépés egyszerűen beilleszthető. Hátránya, hogy egy-egy marás során elért nanotopográfia maradéktalanul nem reprodukálható, hiszen a marás körülményeinek egy része nem kontrollálható teljes mértékben (pl. DRIE kamra tisztasága).

A mérésekhez különféle felületfedéssel rendelkező mintákat készítettünk, valamint nagy felületen nanostrukturált elektródokat is, a fajlagos felület elektrokémiai mérése céljából.

Az eljárás során 4" méretű, (100) orientációjú 380 µm vastag, egy oldalon polírozott Si szelet felületére termális oxidációval 500 µm vastag SiO<sub>2</sub> került. Ezt követte az 1000 µm vastag poliSi réteg alacsony nyomású kémiai gőzfázisú leválasztással Tempress LPCVD berendezéssel [164] SiH<sub>4</sub> gáz 250 sccm áramoltatásával 630 °C vagy 610 °C hőmérsékleten. A polikristályos szilíciumréteg mikro-mintázására fotolitográfiát követően a polikristályos Si marását alkalmaztuk 10 percen át HF:HNO<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH = 3:2:5 oldatban. A fekete szilícium kialakításához Oxford Plasmalab 100 [165] mély reaktív ionmarót használtunk. A fotoreziszt felrepedezésének elkerülése érdekében a mintázat kialakítását követően 40 percen keresztül 150 °C hőmérsékleten kezeltük a szeleteket. A plazmamarási lépés előtt a jobb reprodukálhatóság érdekében a kamra kondicionálására került sor. A kamrába egy teszt szelet („dummy wafer”) került, melyen 10 perc SF<sub>6</sub>, majd 45 perc O<sub>2</sub> plazmamarást hajtottunk végre. Ezt követően az éles mintán alkalmazott marási recept 1 percig futott a megfelelő hőmérsékletre hűtött kamrában.

A nanostrukturák készítésének technológiai sorát a függelékben az F1 ábra foglalja össze.

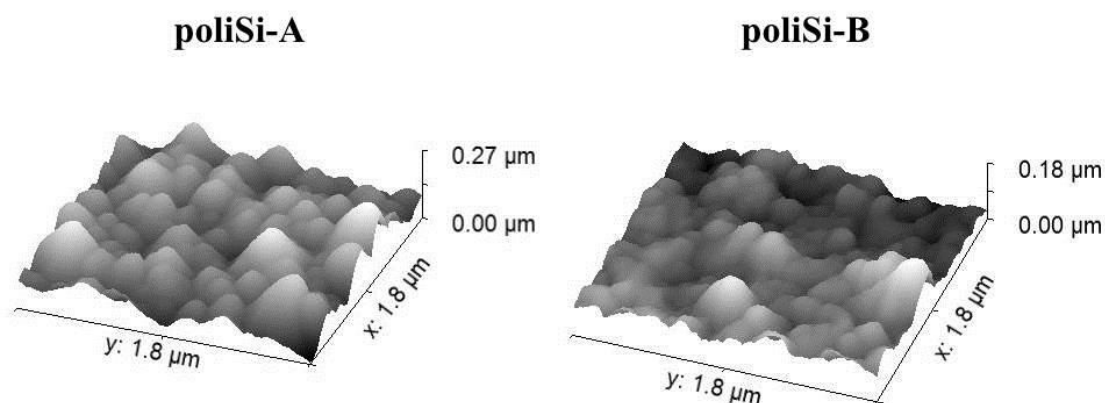
A mintakészítés során vizsgált marási paramétereket a 2. táblázat tartalmazza.

Minta elnevezése	poliSi leválasztási hőmérséklet	O <sub>2</sub> térfogatáram [sccm]	Marási hőmérséklet [°C]	P <sub>RF</sub> [W]	Mintatelítettség [%]
poliSi-A	630°C	10,15	-110, -100, -90	2,3	10,90
poliSi-B	610°C				
cSi	-				

**2. táblázat A munka során felhasznált nanostrukturált minták különféle marási paramétereinek összefoglalása. Az összes kísérletben állandóak voltak az alábbi paraméterek: SF<sub>6</sub> térfogatáram= 40 sccm; kamranyomás: 40 mTorr; marási idő=1 perc; P<sub>ICP</sub>=700 W**

### 3.1.2. A polikristályos szilícium leválasztási hőmérsékletének hatása a kiindulási rétegre

A polikristályos szilícium leválasztási hőmérséklete hatással van a kialakuló réteg szemcseméretére és kristályorientáció-eloszlására. Kísérleteink során a nanostrukturálás kiinduló rétegeként két típusú polikristályos szilícium réteget vizsgáltunk, az egyiket 610 °C-on, a másikat 630 °C-on választottuk le, ezekre a következőkben poliSi-A, és poliSi-B rétegeként fogok hivatkozni (ld. 2. táblázat). A két felület jellemző szemcseméretét a 4. ábrán látható atomerő mikroszkópos felvételek mutatják. A mért RMS érdesség a poliSi-A esetében  $34,8 \text{ nm} \pm 0,81 \text{ nm}$ , a poliSi-B esetében  $24,5 \text{ nm} \pm 3,05 \text{ nm}$ . Az adatok egy gyártott mintaszelet 3-3 mérésének átlagából származnak. Az átlagos szemcseméret a poliSi-A esetében  $246,3129 \text{ nm} \pm 88,371 \text{ nm}$ , a poliSi-B esetében  $181,372 \text{ nm} \pm 60,339 \text{ nm}$ . A rétegekben előforduló kristályorientációkat röntgen diffrakcióval (Bruker AXS D8 Discover berendezéssel [166]) vizsgálva fény derült rá, hogy ebben a tulajdonságban is jelentős különbségek mutatkoznak köztük. Míg a poliSi-A réteg esetében az (110) kristályorientáció a domináns, addig a poliSi-B mintában egyensúlyban van az (111) és az (110) orientáció előfordulása.



4. ábra A két különböző hőmérsékleten leválasztott polikristályos Si réteg reprezentatív AFM felvétele

### 3.1.3. Nanostrukturált felületek karakterizációja

A nanostrukturált minták felületét LEO XB1540 pásztázó elektronmikroszkóppal [167] készült felvételek alapján ImageJ [168] szoftveres képelemzéssel karakterizáltuk. A minták jellemzésére két paramétert, az oszlopok sűrűségét és magasságát használtuk. Az oszlop sűrűség a marás során a felületen maradó, véletlenszerűen elhelyezkedő mikromaszkoló kontaminációk számának felel meg, és  $1 \mu\text{m}^2$ -re normalizáltuk. A felvételek készítéséhez a minták 30°-ban döntve helyezkedtek el a mikroszkóp mintakamrájában. Az oszlopmagasság az egy mintán elhelyezkedő oszlopok átlag magasságát jelenti, és a marás sebessége határozza



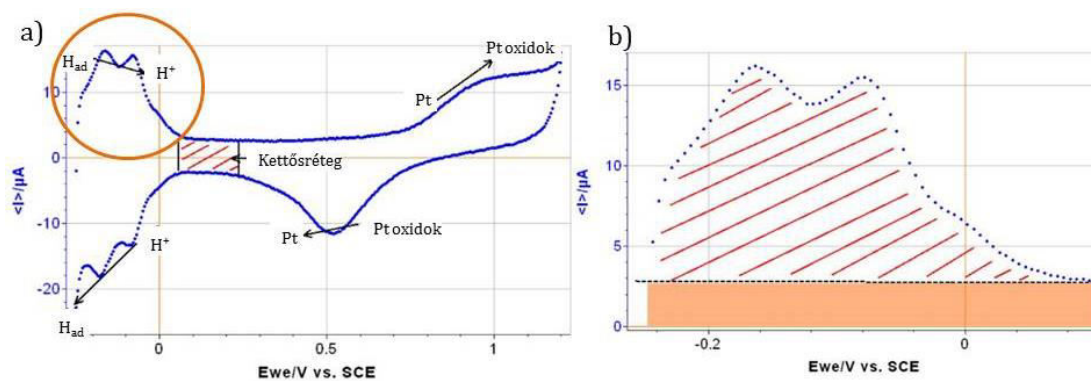
meg. A keresztmetszeti felvételeket  $10^\circ$ -os mintadőlési szögben vizsgáltuk. Minden értéket legalább három, azonos marási paraméterekkel készült minta vizsgálatával számítottuk. A nanostrukturált felületek morfológiai jellemzőinek a marás paramétereitől való függését vizsgáltuk.

### 3.1.4. Fajlagos felület mérése elektrokémiai módszerekkel

Az agyszövetben elhelyezkedő elektród tulajdonképpen egy elektrolitba merülő fémelektrod, mely impedanciájának alakulásában jelentős szerepet játszik a fém-elektrolit határfelületen kialakuló kettősréteg (ún. Helmholtz kettősréteg) kapacitása. A kapacitás impedanciája fordítottan arányos az elektród felületének nagyságával, így az elektród aktív felületének mérete igen nagy befolyással bír az elektród impedanciájára, és így a mérés jel/zaj viszonyára [169]. Ezért az elektród fajlagos felületének növelése lehetővé teszi az impedanciájának csökkentését anélkül, hogy a beültetendő eszköz geometriáján szükséges lenne változtatni.

A kialakított nanostrukturák fajlagos felületének mérése kifejezetten erre a célra tervezett, nagy nanostrukturált felülettel rendelkező mérőelektrodák segítségével, ciklikus voltammetriával (CV, Cyclic Voltammetry) történt, az impedancia csökkenését pedig elektrokémiai impedancia spektroszkópiával (EIS, Electrochemical Impedance Spectroscopy) vizsgáltuk Gamry Reference 600 berendezéssel [170].

A  $0,25 \text{ cm}^2$  felületű mintákra 15 nm Ti tapadóréteg porlasztását követően 100 nm vastag platinaréteget porlasztottunk. Mind a CV, mind az EIS mérések háromelektrodos standard elektrokémiai cellában történtek Ag/AgCl referencia és nagy felületű platina ellenelektrod használatával, Faraday kalitkában. A CV méréshez  $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ -t, az EIS mérésekhez Ringerlaktát [171] sóoldatot használtunk. A kísérleti paraméterek beállításához és a mérésekhez a Gamry Framework 6.02, az eredmények megjelenítéséhez és elemzéséhez a Gamry Echem Analyst 6.02 szoftvereket alkalmaztuk [172].  $500 \text{ mV/s}$  pásztázási sebességet és  $25 \text{ mV RMS}$  nagyságú szinusz jelet használtunk a görbék felvételéhez. Az aktív felületet a CV görbék alapján a következők szerint számítottuk [173], [174]. A platina redukójakor a savas közegből protonok adszorbeálódnak a felületen, melyek aztán az oxidáció során deszorbeálódnak. A deszorbeálódó protonok számából következtethetünk az adszorpciós helyek számára, vagyis az aktív felületre, feltételezve, hogy monoréteg alakul ki és minden Pt-n egy  $\text{H}^+$  adszorbeálódik. Tehát azon a szakaszon, melyen ez a folyamat történik, a töltésmennyiség meghatározása során következtethetünk az elektród aktív felületének nagyságára [174]. A deszorbeálódó töltésmennyiség a felület adott szakaszának integráljával számítható, ahogy az 5. ábrán látható.



5. ábra Platina elektród CV görbéjének jellemző szakaszai (a), és az aktív felület meghatározásához felhasznált tartomány (b). [174]

Az egyes mérési görbéken az 5.b. ábrán kijelölt részek integrálját számítottuk, és azt a referencia elektródok görbéinek megfelelő része integráljának átlagához normáltuk, így kaptuk meg a felületnövekedés mértékét.

### 3.1.5. A mérések helyszíne és résztvevői

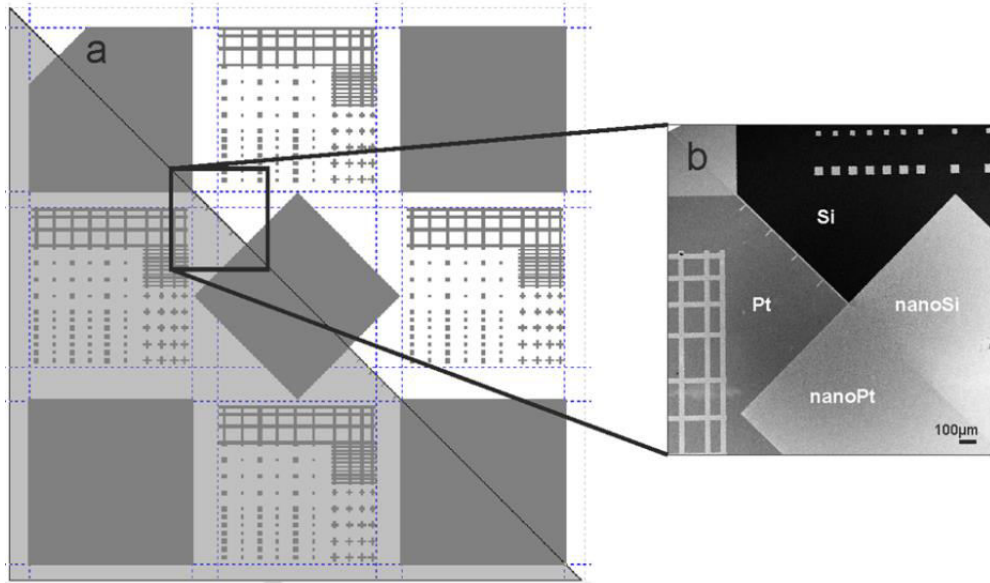
A dolgozatban szereplő minden minta technológiai gyártási folyamatai az MTA EK MFA Mikrotechnológia Osztályának MEMS laborjában zajlottak. A felületek pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatában dr. Tóth Attila, Illés Levente és Straszner András segítettek, az elektrokémiai mérésekben Horváth Ágoston vett részt.

## 3.2. Immortalizált sejtek *in vitro* vizsgálatának körülményei

### 3.2.1. Mintatervezés és gyártás

Az *in vitro* mikroszkópos mérésekhez tervezett 7,1 mm x 7,1 mm méretű chipen négy féle felület helyezkedik el. A tenyésztőlemezek mintázatát a 6. ábra mutatja. A négy féle vizsgált felületet illetően a továbbiakban az alábbi nevezéktan lesz használatban: polikristályos Si felület: **Si**, fekete szilíciummal nanostrukturált felület: **nanoSi**, platínával bevont polikristályos szilícium: **Pt**, platina bevonattal ellátott nanostrukturált szilícium: **nanoPt**.

Az egyes mintákon különféle méretű sima és nanostrukturált felületek helyezkednek el, annak érdekében, hogy nagyobb egybefüggő felületeken (2 mm x 2 mm) és az elektródok kontaktusméretének megfelelő méretű felületeken (30  $\mu\text{m}$  x 30  $\mu\text{m}$  vagy 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ ) is vizsgálható legyen mikroszkóp alatt a sejtek viselkedése.



**6. ábra** *In vitro* tesztszekek felépítése. A rajzolat alapján láthatóak az elkülönített régiók különböző felületi mintázatokkal és anyagi minőséggel. Az a ábrán az átlós vonaltól balra platinával fedett terület, míg jobbra fedetlen polikristályos szilícium található. A sötétebb részek mindkét oldalon a nanostrukturált mintázatot mutatják.

A kvantitatív mérésekhez tervezett, 96 lyukú tenyésztőlemez lyukaiba illeszkedő 3,2 mm x 3,2 mm-es minták teljes felületén a fenti négy felszínből egy-egy helyezkedik el, így lehetővé téve az egyes felületeken tenyésztett sejtek viselkedésének felületek közti kvantitatív összehasonlítását.

A chipgyártás lépései a mikrotechnológia standard eljárásaival valósultak meg, a technológiai lépések leírását a függelék tartalmazza és az F2 ábra mutatja.

### 3.2.2. Idegi őssejt és immortalizált mikroglia sejt kultúrák tenyésztési módszerei

GFP NE-4C (ATCC CRL-2936) sejteket, az NE-4C neuroektodermális őssejt vonal GFP-t expresszáló szubklónját használtuk az őssejtek viselkedését vizsgáló *in vitro* méréseinkhez.

A sejtek MEM-FCS-ben (Minimal Essential Medium - Sigma Aldrich Corp, USA, 10% borjú szérum albuminnal – Gibco BRL Life Technologies UK) voltak fenntartva, 4 mM glutaminnal, és 40 μg/ml gentamicinnel (Chinoin Private Co, Magyarország) 37 °C-n, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában poli-L-lizinnel bevont tenyésztőlemezekre. A közel konfluens tenyészeteket tripszinizációval feleztük, 0,05% (w/v) tripszin tartalmú PBS oldattal, majd ismét tenyésztőlemezekre kerültek.

A mikroglia sejtek viselkedésének megfigyelésére a BV2 immortalizált egér mikroglialis sejteket poli-L-lizinnel bevont tenyésztő csövekben tartottuk fenn MEM-ben, 10% FCS és 100 U/ml penicillin-streptomycin adalékokkal.

A sejteket a vizsgált mintákra történő kiültetés előtt tripszin oldattal (0,05% tripszin és 1mM EDTA PBS-ben), 1 perces kezeléssel választottuk le a felületről, majd kiültetés előtt PBS-ben öblítettük.

A szilícium mintákat a kísérletek előtt 70%-os etanolban mostuk 20 percig, majd hőlégmentesítőben tettük csíramentessé. A mintákat méretüktől függően 24 (7,1 mm x 7,1 mm minták), illetve 96 (3,2 mm x 3,2 mm minták) lyukú sejtenyésztő lemezbe helyeztük.

### 3.2.3. Életképesség és sejtlepedés vizsgálatok

A toxikusság és életképesség vizsgálatokhoz a sejteket a 3,2 mm x 3,2 mm méretű különböző felületű szilícium lemezekre  $10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűségben ültettük ki. Referenciaként a mintákkal azonos méretű, sejtenyésztésben általánosan felhasznált üveg felületeket használtunk. A felületeket nem láttuk el poli-L-lizin bevonattal. A kiültetett sejteket a tesztfelületeken 4 illetve 24 órán keresztül inkubáltuk MEM-FCS-ben 37 °C-n, 5% CO<sub>2</sub> inkubátorban.

A felületre tapadt sejtek mennyiségét, ez által az adott felületen a sejtek életképességét MTT redukciós esszével vizsgáltuk. Először a szilícium, illetve üveg mintákat, melyeken a sejtek találhatóak eltávolítottuk a sejtenyésztésre szolgáló edényből, és PBS-sel mostuk, majd egy olyan tenyésztőlemez lyukaiba helyeztük őket, melyek 50 µl/lyuk tiszta tápoldatot tartalmaztak. Ezt követően minden mintához 10 µl MTT-t (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2-5-dyphenil-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Corp. USA) adtunk, és a sejteket 90 percig inkubáltuk az oldatban CO<sub>2</sub> inkubátorban. A képződő formazán kristályokat és a sejtanyagot ezután feloldottuk 0,08N HCl – izopropilalkohol oldatban. Az így képződött oldatot tiszta 96 lyukú sejtenyésztő lemezbe pipettáztuk, és a minták formazán tartalmát fényabszorpcióval mértük egy Tecan F50 plate olvasóban [175] 570 nm mérő és 630 nm referencia megvilágítással. A méréseket háromszor ismételtük, mérésenként és típusonként 6-8 azonos szilícium mintával.

A felületekre 4 és 24 órás inkubációs idő után letapadt NE-4C és BV2 sejtek számát a sejtmagok fluorometriás mérésével is vizsgáltuk. A különböző felületeken tenyésztett sejteket 4%(w/v) paraformaldehidet tartalmazó PBS oldattal fixáltuk 20 percig szobahőmérsékleten, majd PBS-sel mostuk. Ezt követően a sejtmagokat DAPI-val (4'-6-diamidino-2-phenilindole;Sigma-Aldrich) festettük. A DAPI fluoreszcenciáját 360 nm-es gerjesztési hullámhosszal, 460 nm-en mértük egy TECAN SPARK 20 olvasóval [176], „top-fluoreszcencia” módban, 26 pozíció „multi read” beállításban.

A statisztikai elemzéseket IBM SPSS Statistics [177]szoftverrel végeztük, meghatároztuk az adatok átlagát és szórását. A normál eloszlás Shapiro-Wilk teszttel történő ellenőrzését követően, a normál eloszlású adatsorokon ANOVA tesztet, majd Tukey post-hoc tesztet, nem

normál eloszlású adatsorokon Kruskal-Wallis tesztet végeztünk,  $p=0,05$  szignifikancia szinttel. [178], [179]

### 3.2.4. Indukció: idegsejtképződés *in vitro*

A GFP NE-4C sejteket  $2 \times 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> sejtszámban ültettük ki a 7,1 mm x 7,1 mm-es szilícium (Pt bevonattal vagy anélkül), illetve referencia üveg felületekre. Két óra letapadási időt követően a tenyésztésre használt (korábbiakban ismertetett) MEM-FCS oldathoz  $10^{-6}$  M *all-transz-retinsavat* adtunk (RA). 24 óra múlva az indukáló oldatot szérumentes DMEM-F12/ITS oldatra cseréltük (DMEM:F12 (1:1), 1%v/v inzulin-transzferrin-szelenit (Sigma Aldrich), RA nélkül. Ezt követően, a 4. naptól két naponként, a tenyésztő oldat felét friss oldatra cseréltük, minimalizálva ezzel a fejlődő sejtek mechanikai és kémiai sérülését. A sejteket 9 napig tenyésztettük.

### 3.2.5. Sejttenyészetek fixálása mikroszkópos vizsgálatokhoz

#### Nem indukált sejtek

A letapadási és túlélési vizsgálatokhoz a sejteket 4 vagy 24 órával a kiültetés után a szilícium lemezekre PBS-sel mostuk, majd 4% w/v paraformaldehid tartalmú PBS-sel fixáltuk 20 percig szobahőmérsékleten. A fixáló oldat PBS-ben való lemosása után a szilícium mintákat bisbensimidet (BB) tartalmazó Mowiolal (Mowiol 4.88 Polysciences Inc. Németország) mikroszkóp tárgylemezekre rögzítettük és a vizsgálatok előtt 24 órán át szobahőmérsékleten szárítottuk. A bisbensimid egy olyan nukleinsav specifikus festék, mely a fixált sejtmembránon, és a sejtmaghártyán is áthatolva a sejtek DNS-ét festi, annak A-T régióhoz kötve, így a sejtmagok megfelelő gerjesztési megvilágításban, megfelelő hullámhosszon vizsgálva láthatóvá válnak. Az elkészült minták fluoreszcens mikroszkóppal két csatornán vizsgálhatóak. A 359 nm gerjesztési fényben a sejtmag kék, míg 495 nm gerjesztő fény esetén a GFP-t expresszált sejt plazma zöld színben válik megfigyelhetővé.

#### Indukált tenyészetek

A differenciált tenyészeteket tartalmazó szilícium mintákat a 9 napos tenyésztési idő után PBS-ben mostuk, majd szintén 4% w/v paraformaldehid tartalmú PBS oldatban 20 perc alatt fixáltuk szobahőmérsékleten. A fixáló oldatot PBS-sel mostuk le a mintákról. Ezt követően a neuronok láthatóvá tételéhez a mintákat neuron specifikus III $\beta$ -tubulinnal festettük standard immuncitokémiai eljárásokkal. A sejtmembránokat permeabilizáltuk 0,1% v/v Triton-X100 tartalmú PBS oldattal 5 percig, majd a nem specifikus antitestkötődést megakadályozandó, 3% FCS tartalmú PBS oldattal inkubáltuk a tenyészeteket 90 percen keresztül. Ezután a mintákat elsődleges antitestekkel kezeltük (anti-III $\beta$  tubulin, egér, IgG, Exbio, Prága) 4 °C-n 24 órán át. Három mosási lépést követően hozzáadtuk a tenyészetekhez a másodlagos antitesteket

tartalmazó oldatot (Alexa Fluor594-hez kötött kecske-anti egér IgG másodlagos antitestek, Invitrogen, Thermo Fischer Sci Corp., USA) és 90 percig inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten. Ezt követően a festett tenyészeteket tartalmazó szilícium lemezeket az előzőekhez hasonlóan tárgylemezre helyeztük, és BB-t tartalmazó Mowiolal<sup>®</sup> rögzítettük, majd 24 órán át szobahőmérsékleten szárítottuk.

### 3.2.6. Mikroszkópia

Az elkészített mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Egy Zeiss AxioVertA [180] berendezést használtunk Zeiss Zen Blue Edition szoftverrel [181] és egy Zeiss Axiovert200M [182] berendezést, AxioVision 4.8 szoftverrel [183] és AxioCam digitális kamerával [184]. A minták vizsgálatához felhasznált fluorofórok gerjesztési és kibocsájtott hullámhosszait a 2.1.1. fejezetben az 1. táblázat tartalmazza.

A 3. táblázat a neuroektodermális őssejtekkel, és immortalizált mikroglia sejtekkel végzett *in vitro* mérések összefoglalását tartalmazza.

GFP NE-4C neuroektodermális őssejtek		BV2 immortalizált mikroglia sejtek
<ul style="list-style-type: none"> <li>Életképességi és sejtletapadási vizsgálatok: MTT esszé és DAPI fotometriás esszé</li> <li>Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok (sejtmag, sejtplazma)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vitro</i> differenciálódás vizsgálata (retinsavas indukció)</li> <li>Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok: sejtmag, sejtplazma, idegsejt nyúlványok</li> </ul>	Életképességi és sejtletapadási vizsgálatok: DAPI fotometriás esszé
4 h vagy 24 h időtartam	9 napos tenyésztési idő	4 h vagy 24 h időtartam
Egységes felszínű 3,2 mm x 3,2 mm minták (poliSi - <b>Si</b> , nanostrukturált poliSi- <b>nanoSi</b> , poliSi+Pt - <b>Pt</b> , nanoSi+Pt - <b>nanoPt</b> )	Mikromintázatban nanostrukturált 7,1 mm x 7,1 mm teszchip 4 féle felszínnel (6. ábra)	Egységes felszínű 3,2 mm x 3,2 mm minták (poliSi - <b>Si</b> , nanostrukturált poliSi- <b>nanoSi</b> , poliSi+Pt - <b>Pt</b> , nanoSi+Pt - <b>nanoPt</b> )

3. táblázat NE-4C sejtekkel és BV2 sejtekkel végzett kísérletek összefoglalása

### 3.2.7. A mérések helyszíne és résztvevői

A GFP NE-4C sejtek és BV2 sejtek tenyésztése és fixálása, valamint az MTT fotometriás mérések és a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok az MTA KOKI Neuroimmunológia csoportjának laborjaiban készültek dr. Madarász Emília vezetésével. A tenyészeteket Jády Attila, Pomothy Judit és Kőhidi Tímea készítették. A sejtmagok kvantitatív fluoreszcens vizsgálata a PPKE ITK-n készült.

## 3.3. Primer sejtek *in vitro* vizsgálatának körülményei

### 3.3.1. Primer egér asztroglia sejtek tenyésztése

A primer egér asztroglia sejtek 0-4 napos egerek teljes agykérgéből származtak.

A CD1 vad típusú kísérleti egereket (Charles River Laboratories, Wilmington MA, USA)  $22 \pm 1$  °C hőmérsékleten, 12 órás fény/sötét ciklus, valamint élelemhez és vízhez való szabad hozzáférés mellett tartottuk az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológiai Intézetének állatházában. Minden elvégzett kísérlet eleget tett a hatályos magyar és Európai Unió előírásoknak és szabályozásnak (PEI/001/1108-4/2013 és PEI/001/1109-4/2013).

Az agyhártyáktól megtisztított agyféltekéket feldaraboltuk, majd 0,05 % tripszin – 0,02 % EDTA és 0,05 % DNáz I (Sigma) tartalmú oldatban emésztettük 15 percig 37 °C hőmérsékleten. Az emésztést FCS-sel állítottuk le, majd a mechanikailag disszociáltatott sejtekből álló szuszpenziót 42 µm pórusátmérőjű steril szűrőn engedték át. Az asztrocitákat 0,002 mg/ml koncentrációjú poli-L-lizinnel borított Petri csészékben tartottuk fenn, asztroglia tenyésztőfolyadékban (magas glükóz-tartalmú HDMEM (Sigma) tápfolyadék, 10 % FCS, 40 µg/ml gentamicin, 2,5 µg/ml amphotericin B), 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszféra mellett. A sejteket felhasználás előtt legalább kétszer átültettük 0,05 % tripszin – 0,02 % EDTA oldat segítségével. [185]

A mérésekhez a 3.2.1. fejezetben ismertetett 7,1 mm x 7,1 mm-es mintákat használtuk. A tesztmintákat 4 órán át 180°C-on sterilizáltuk, majd 24 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük. Az asztroglia sejteket  $2,6 \times 10^4$  sejt/cm<sup>2</sup> sűrűségben helyeztük a mintákra. A kultúrákat 24 illetve 48 órán keresztül tartottuk fenn 37 °C inkubátorban 5% CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszférában.

### 3.3.2. Primer asztroglia tenyészetek fixálása és festése

A tenyészetek fixálását és festését standard immuncitokémiai eljárásokkal végeztük, melyeket az alábbiakban részletezünk. A 24 órás, illetve 48 órás tenyésztési idők leteltével a sejteket 4% paraformaldehid (TAAB) tartalmú PBS-sel fixáltuk 20 percig szobahőmérsékleten, majd 0,1%

Triton-X-100 tartalmú PBS oldatban permeabilizáltuk 5 percen keresztül szintén szobahőmérsékleten. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása 2%-os BSA (Sigma) tartalmú PBS oldatban történt szobahőmérsékleten, 60 percig. A sejtek GFAP immunfestésére elsődleges antitestként anti-GFAP ellenanyagot használtunk (1:1000, egér, monoklonális, Sigma), egy éjszakán át tartó inkubációs idővel 4 °C-n. Másodlagos antitestként anti-egér-Alexa488 (1:500, Molecular Probes) festéket alkalmaztunk, szobahőmérsékleten, 60 perces inkubációs idővel. Az aktin filamentumok megfigyelhetővé tételére a GFAP festés folyamata során, a másodlagos ellenanyaggal párhuzamosan Alexa546 konjugált falloidint (1:300, Molecular Probes) alkalmaztunk. A sejtmagok festésére Mowiol 4.88<sup>®</sup>-ban (Polysciences, Hamburg, Németország) oldott DAPI-t használtunk, mellyel egyúttal a mintákat tárgylemezhez rögzítettük.

### **3.3.3. Tenyészetek vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával**

Az elkészült mintákat Zeiss Axio Observer Z1 mikroszkóppal [186], Zeiss Colibri white LED megvilágítási rendszer [187] segítségével vizsgáltuk. A mikroszkópos felvételeket AxioCamMR3 kamerával [184] készítettük. A sejtszámok meghatározása céljából a teljes mintákról 10x-es nagyítással ([EC Plan-Neofluar] 10x/0,30 [Ph 1]) készítettük mozaik felvételeket. Az egyes sejtek morfológiájának vizsgálatához 20x ([Plan-Neofluar] 20x/0,50) és 40x ([LD Plan-Neofluar] 40x/0,6 [Korr Ph 2 M27]), többcsatornás felvételeket készítettünk. Ezeken a sejtmagok alakját, és a citoskeleton szerkezetét figyeltük meg a 2.4. fejezetben ismertetett paraméterek alapján.

### **3.3.4. Sejtszámok kvantitatív vizsgálata**

A sejtszámok meghatározására a DAPI csatorna jeleit használtuk fel. A teljes chipekről 10x nagyítású mozaik felvételek készültek, ezeken jelöltük ki a vizsgálandó területeit (ROI, Region of Interest). A kijelölt területeken manuálisan számoltuk a sejtmagokat, és a terület nagysága alapján meghatároztuk a sejtsűrűséget (sejt/mm<sup>2</sup>), majd azt a Si felület sejtszámához normáltuk. Kísérleteinkben egy mintán négy felülettípus található (ld. 6. ábra). A ROI-k kijelölése során arra törekedtünk, hogy a kijelölt területek egymáshoz minél közelebb essenek, kiküszöbölve ezzel a kiültetés során keletkezett sejtkoncentráció gradiens hatását. A sejtek számolásánál fontos megkülönböztetni a feltehetően életképes sejtekhez tartozó, és az apoptotizáló sejtek magjait. Utóbbiak kicsik, és igen fényes DAPI jelet adnak. A meghatározott, normált sejtszámok összehasonlítását IBM SPSS Statistics szoftverrel [177] végeztük, meghatároztuk azok átlagát és szórását. A normál eloszlás Shapiro-Wilk teszttel történő ellenőrzését követően, mivel az adatsorok normál eloszlást mutattak, ANOVA tesztet, majd Least Significant Difference (LSD) post-hoc tesztet végeztünk p=0,05 szignifikancia szinttel. [178], [179]



### 3.3.5. Tenyésztett sejtek morfológiai vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóppal

A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a sejteket 2,5% glutáraldehid (Sigma) és 5% szacharóz tartalmú 0,1M kakodilát puffer oldatban fixáltuk. A tenyészeteket felszálló alkoholsorban dehidratáltuk (50%, 65%, 70%, 90%, 96%), lépésenként 20 percen keresztül, majd szobahőmérsékleten amil-acetátot párologtattunk el a mintákról. A mikroszkópos vizsgálatok előtt a mintákra 20 nm aranyréteget porlasztottunk. A fixált mintákat LEO XB1540 [167] elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételeken a sejt felszín morfológiáját, a sejtmagok alakját, és a sejtek különféle felületekhez való tapadási pontjait tanulmányoztuk.

A 4. táblázat a primer asztrogliá sejtekkel végzett *in vitro* mérések összefoglalását tartalmazza

Primer asztrogliá sejtek		
Kvantitatív sejtszám elemzés	Morfológiai vizsgálatok	
24 h vagy 48 h időtartam		
Mikromintázatban nanostrukturált 7,1 mm x 7,1 mm teszchip 4 féle felszínnel (6. ábra) A vizsgált felületek a mintákon: poliSi - <b>Si</b> , nanostrukturált poliSi- <b>nanoSi</b> , poliSi+Pt - <b>Pt</b> , nanoSi+Pt – <b>nanoPt</b>		
Fénymikroszkópos mozaikfelvételek, majd sejtszámlálás	Fluoreszcens mikroszkópos sejt morfológia elemzés: sejt vázfehérjék (aktin, GFAP) és sejtmagok	Pásztázó elektronmikroszkópos sejt felszíni morfológia vizsgálat

4. táblázat Primer asztrogliá sejtekkel végzett mérések összefoglalása

### 3.3.6. A mérések helyszíne és résztvevői

A primer asztrogliá tenyészetek izolálása és tenyésztése, valamint a tenyészetek fixálása és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata az ELTE TTK Élettani és Neurobiológiai tanszékén készült dr. Schlett Katalin vezetésével. A tenyészetek készítését, gondozását, fixálását Liliom Hanna készítette, a mikroszkópos vizsgálatokon Csernyus Bence dolgozott. A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok előkészítésében dr. Lőw Péter működött közre, a SEM mérések az MTA EK MFA-ban készültek.

### 3.4. *In vivo* mérések körülményei

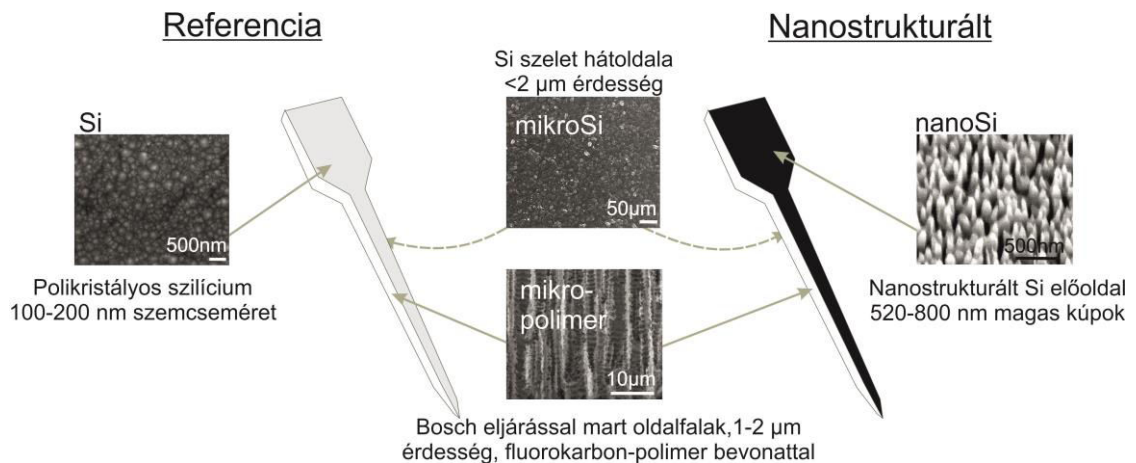
#### 3.4.1. Minták tervezése és gyártása

Az *in vivo* kísérletekhez két típusú mintát terveztünk, összesen 4 féle felület vizsgálatára. Mindkét eszköz 11 mm hosszú, 180  $\mu\text{m}$  x 380  $\mu\text{m}$  téglalap keresztmetszettel. A kétféle eszköz egyike az előoldalon sima a másik pedig nanostrukturált felülettel rendelkezik. Az előbbit a továbbiakban referencia, míg a másikat nanostrukturált eszközként fogom említeni.

A referencia minta elülső felülete polikristályos szilícium, a nanostrukturált eszköze pedig a már ismertetett módszerrel (3.1.1. fejezet) készült nanostrukturált polikristályos Si. A két eszköz oldalfalai megegyeznek, az eszközök kontúrmarási folyamatából adódóan mikrostrukturáltak, és a folyamatban a felületre került fluorokarbon-polimer bevonattal ellátottak. Az eszközök hátoldala szintén azonos, nem polírozott, emiatt néhány mikrométer mérettartományban érdes ún. csiszolt szilícium felület. Minden eszköz egyes oldalai teljes felszínükön egységesen az adott felületekkel borítottak.

A 7. ábra az elkészült implantátumok különböző felületeit ábrázolja sematikusán. A továbbiakban az ábrán is szereplő nevezéktant használom a különböző felületek azonosítására.

A referencia eszköz előoldalán található felületre **Si**, az oldalfalakra **mikro-polimer**, a hátoldalakra **mikroSi**, a nanostrukturált eszköz előoldalára pedig a továbbiakban **nanoSi** névvel hivatkozom.



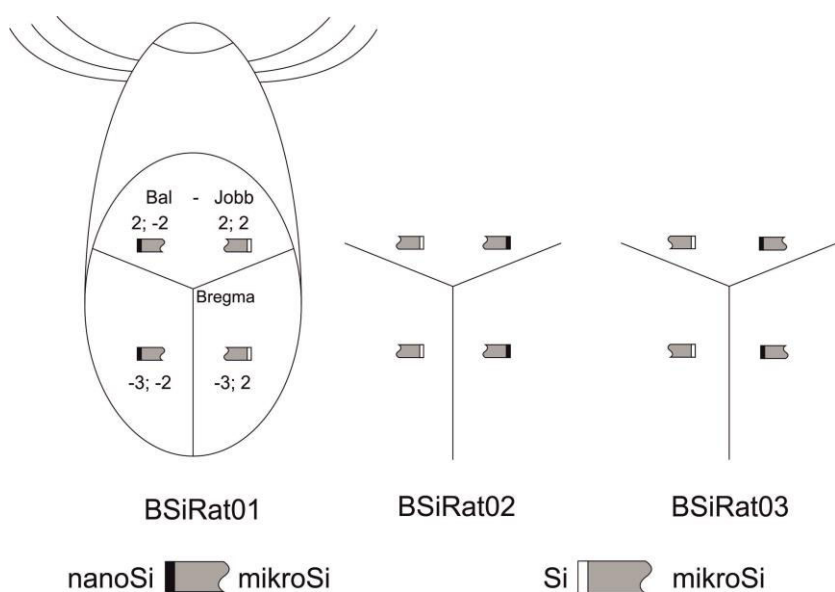
7. ábra *In vivo* vizsgálathoz használt minták és különféle felületeik

### 3.4.2. Implantáció és a szövet előkészítése, immunfestések

Az *in vivo* méréseket 3 Wistar patkány agyszövetében végeztük. A felhasználandó élő állatok minimalizálása érdekében 4-4 eszközt implantáltunk, így összesen 12 beültetett eszköz eredményeit vizsgáltuk, 6 nanostrukturált és 6 referencia tüt.

Az állatkísérletek az MTA Természettudományi Kutatóközpontjának Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet etikai szabályaival összhangban zajlottak. Minden elvégzett kísérlet eleget tett a hatályos magyar és Európai Unió előírásoknak és szabályozásnak.

Az anesztézia testsúly kilogrammonként 3 mg intraperitonális injektálásával történt az alábbi oldatból: 37,5 mg/ml ketamin és 5 mg/ml xylazin. Az alvó állapotot ugyanezen oldat intramuszkuláris injektálása tartotta fenn a műtét ideje alatt (0,3 ml/óra). Elektromos fűtő pad biztosította az egyenletes 37 °C testhőmérsékletet. Az állatok koponyáját sztereotaxis keretben rögzítettük (David Kopf Instruments [188]). A scalp borotválását, és bemetszését követően lehetett a koponyához férni. A koponyacsontba 2 mm x 2 mm ablakok fúrása történt, melyeken keresztül az eszközök implantálhatóak és rögzíthetőek voltak. A pozíciók sztereotaxikus koordinátáit a 8. ábra mutatja. A koponyanyílásokban a keményagyhártya (dura mater) kiszáradását Ringer oldat folyamatos fecskendezésével gátoltuk meg. A dura mater csak közvetlenül az implantáció előtt lett megnyitva. Az implantátumokat úgy helyeztük el, hogy azonos számú nanostrukturált és referencia minta legyen implantálva a 4 különböző kraniotómias ablakba, és egyes implantátumok esetén a nanostrukturált felületek mediális, mások esetében laterális irányba néztek, elkerülve ezzel olyan ismeretlen biológiai hatásokat, melyek az eredményeket befolyásolhatnák.



8. ábra Az eszközök beültetési koordinátái és orientációja

8 héttel az implantációt követően az állatok ketamin/xylazin (73 mg/kg; 10 mg/kg) anesztéziában lettek perfundálva először 5 percen át fizioológias sóoldattal, majd 0,1 M-os foszfát pufferben (PB, pH=7,4) 4 % paraformaldehid és 15 % pikrinsav tartalmú fixáló oldattal. Ezt követően az implantátumokat óvatosan kivettük, az agyat eltávolítottuk és 60 µm vastag horizontális metszeteket készítettünk belőle egy Leica1200S Vibratome [189] segítségével.

Az agyszeletek festését standard immuncitokémiai módszerekkel végeztük az alábbiak szerint. Négy alkalommal megismételt 10 perces PB mosást követően a szeleteket 30%-os szukróz (0,1M PBS-ben) oldatba merítettük 2 napra, majd 3-szor megfagyasztottuk folyékony nitrogén felett, és mostuk 0,1 M PB-ben.

Az endogén peroxid aktivitás tris-pufferelt sóoldatban (TBS, pH=7,4) 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal lett blokkolva, és ezt követően TBS-t használtunk a mosási lépésekhez minden szérummal történő kezelés után (3 x 10 perc) és a szérumok hígításához. A nem specifikus immunoglobulin kötődés 2% kecske szérummal (Vector) és 2% ló szérummal (Vector) lett blokkolva. A neuronok megjelenítéséhez neuron-sejtmag specifikus monoklonális egér antitesteket használtunk (NeuN, Millipore, clone A60, 1:2000), a gliasejtek megjelenítéséhez pedig GFAP-fehérje specifikus egér monoklonális antitestet (GFAP, Millipore, clone GA5, 1:2000). A szeleteket az antitestekkel 2 napon keresztül kezeltük, 4 °C-on. Az immunpozitívnak jelölt anyagok vizualizálásához biotinilált anti-egér IgG-vel (Vector, 1:250), majd avidin-biotin torna-peroxidáz komplexszel inkubáltuk a mintákat (Vector, 1:250, 1,5 órán át).

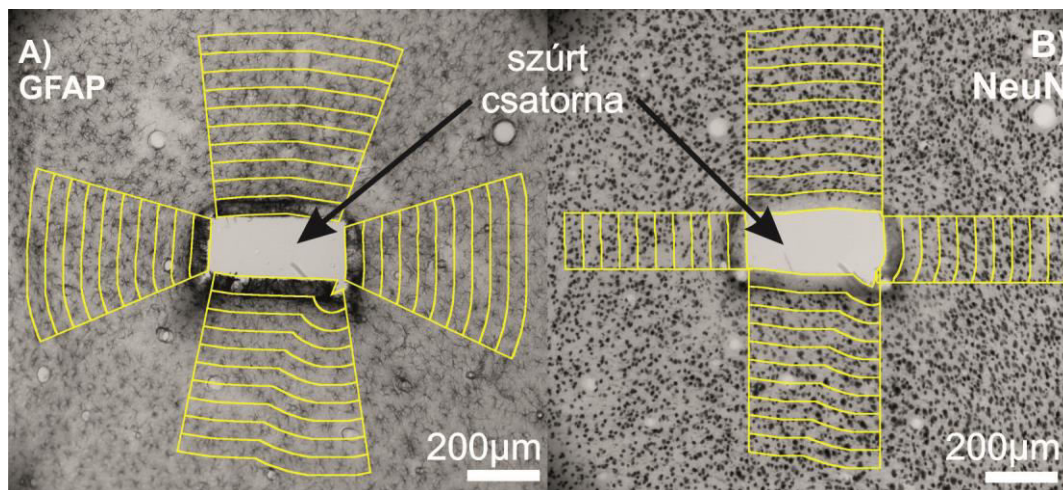
TBS (10 perc) majd Tris Puffer (TB, pH=7,6, 2 x 10 perc) mosást követően a szeleteket 20 percen keresztül előinkubáltuk 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid hidrát kromogénben (DAB, 0,05 % TB-ben) majd előhívtuk 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ben. Az immunopozitív sejtekben barna reakciótermék keletkezett. TB-ben majd PB-ben történő kétszer 10-10 perces mosási lépéseket követően a metszeteket krómzselatinból tárgylemezre szedtük, víztelenítettük (2 x 10 perc xilol), és fedőlemezzel lefedtük.

### **3.4.3. Fénymikroszkópia**

A tárgylemezre rögzített metszetekről egy Zeiss Axio Scope A1 mikroszkóppal [190] és Jai GO-5000M-PGE digitális kamerával [191] fénymikroszkópos felvételeket készítettünk. Az implantációs helyek 10x-es nagyításban egy Zeiss EC Epiplan 10x/0,1HD objektívvel készültek, 5 ms expozíciós idővel. A sérült vagy az implantáció helye körül szakadt szeleteket az analízis során nem vettük figyelembe.

### 3.4.4. Képelemzés módszerei

A felvételeket ImageJ [168] makro segítségével szegmentáltuk általunk definiált mérési területekre (ROI-kra). A tü helyét a felvételeken manuálisan definiáltuk, majd az implantátum helyétől 500  $\mu\text{m}$  távolságig 50  $\mu\text{m}$ -es sávokra osztottuk a szűrt csatorna környezetét, Azemi és munkatársai munkája alapján [127]. (9. ábra)



9. ábra GFAP-val (A) és NeuN-nel (B) festett szeletek fénymikroszkópos felvételén ImageJ szoftverrel kijelölt mérési tartományok az implantátum helye körül

A gliózis mértékét a GFAP-val festett metszeten az egyes ROI-kban mérhető átlagos pixelintenzitással határoztuk meg, a következőképpen: az alkalmazott ImageJ makro által számított átlagos pixelintenzitást vettük alapul, mely érték az ImageJ szoftverben egy 0 és 255 közti érték a szürkeárnyalatos skálán, ahol a 0 felel meg a feketének és 255 a fehérnek. Az egyes sávok átlagos intenzitását, mely a GFAP festődés mértékével arányos, a szűrt csatornától 400-500  $\mu\text{m}$  távolságban található, referenciának tekintett sáv átlagos intenzitásához normalizáltuk. Az egyes mérési tartományokban számított, normalizált átlagos pixelintenzitásokat az implantátum helyétől való távolság függvényében ábrázoltuk.

Az implantátum környezetében bekövetkező sejtpusztulás mértékének meghatározására az szűrt csatorna körül életben maradt, NeuN-nel festett neuronok számát használtuk. A festett neuron magok számát minden ROI-ban manuálisan határoztuk meg, és ez alapján a szűrt csatorna helyétől való távolság függvényében egy átlagos sejt/ $\text{mm}^2$  számot becsültünk meg. Mivel az átlagos neuronszám a különböző kérgi rétegek közt nagy variabilitást mutat, így az átlagos neuronszám meghatározásakor csak azonos kérgi területre eső felvételeket elemeztünk. Az értékeket szintén a szűrt sebtől 400-500 $\mu\text{m}$  távolságban található, referenciaként tekintett területek jellemzőihez normalizáltuk.

Az eredményeket mindkét festés esetében a teljes képkönyvtáron átlagoltunk távolság-intervallumonként.

### 3.4.5. Statisztikai elemzés módszerei

A statisztikai elemzést IBM SPSS Statistics [177] szoftverrel végeztük. Az adatsorok normalitását Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk, majd mivel az eredmények nem mutattak normál eloszlást, a felületek összehasonlítását nem-parametrikus Kruskal-Wallis teszttel végeztük. Ahol a csoportok közt szignifikáns eltérést találtunk, Dunn-Bonferroni post-hoc tesztet végeztünk,  $p=0,05$  szignifikancia szinttel. [178], [179] A mintaszámok a következők voltak:  $N_{\text{mikro-polimer}} = 132$ ,  $N_{\text{mikroSi}} = 66$ ,  $N_{\text{Si}} = 31$ ,  $N_{\text{nanoSi}} = 35$  a GFAP festés esetében, és  $N_{\text{mikro-polimer}} = 50$ ,  $N_{\text{mikroSi}} = 25$ ,  $N_{\text{Si}} = 23$ ,  $N_{\text{nanoSi}} = 23$  a NeuN festés esetében.

Az 5. táblázat az élő agyszövetben végzett *in vivo* mérések összefoglalását tartalmazza.

Gliózis mértékének vizsgálata	Implantátum környezetében túlélő idegsejtek számának vizsgálata
2 típusú implantátum, összesen 4 féle egységes oldalfallal: poliSi – Si, nem polírozott Si – <b>mikroSi</b> , fluorokarbon polimer bevonat mikrostrukturált felületen – <b>mikro-polimer</b> , nanostrukturált Si – <b>nanoSi</b>	
8 hét időtartam	
Fixált szöveten GFAP festés	Fixált szöveten NeuN festés
0-500 $\mu\text{m}$ távolságban 50 $\mu\text{m}$ széles mérési tartományok vizsgálata a különféle felületű oldalfalak közelében	
Referencia területhez (400-500 $\mu\text{m}$ implantátumtól mért távolság) normalizált pixelintenzitás számítása az implantátumtól való távolság függvényében	Referencia területhez (400-500 $\mu\text{m}$ implantátumtól mért távolság) normalizált, egységnyi területre eső sejtszám számítása az implantátumtól való távolság függvényében

5. táblázat Élő agyszövetben végzett mérések összefoglalása

### 3.4.6. A mérések helyszíne és résztvevői

Az *in vivo* vizsgálatok az MTA TTK PKI Összehasonlító Pszichofiziológiai Kutatócsoportjával közösen, dr. Ulbert István vezetésével készültek. Az implantációkat dr. Márton Gergely végezte, a metszeteket és az immunhisztokémiai festéseket dr. Tóth Kinga készítette. A mikroszkópos vizsgálatok és a képelemzés az MTA EK MFA-ban készültek, utóbbiakban Kováts-Megyesi Bálint működött közre.

## 4. Eredmények

### 4.1. Eszköztervezés és gyártás

A fekete szilícium nanostruktúrák előállítása mély reaktív ionmarással (DRIE) történik, az eljárás az agyi elektródok gyártási lépései közé egyszerűen integrálható. Ezáltal lehetővé válik az eszközök szelet szintű felületmódosítása. A fekete szilícium nanostruktúrák kialakulásában számos technológiai tényező hatással van az elkészült felület morfológiájára. A nanostrukturált, platinával bevont kontaktusok nagyobb fajlagos felülettel rendelkeznek a hagyományos, síkfelületű kontaktusokkal szemben, így a biológiai mérésekhez jobb jel/zaj viszonyt biztosíthatnak. Technológiai kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

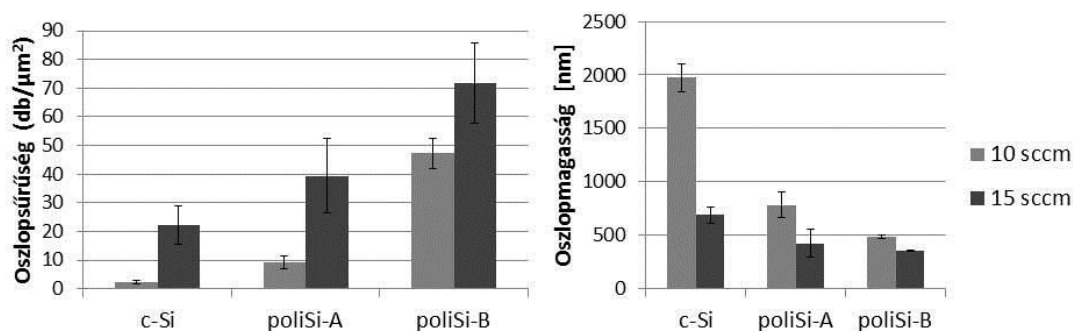
- A nanostruktúrák kialakításának technológiai paraméterei, az alapanyag kristályorientációja, (melyet a polikristályos szilícium leválasztási hőmérséklete befolyásol), a DRIE marás során alkalmazott  $O_2$  térfogatáram, a marási hőmérséklet, az RF teljesítmény, valamint a felület nanostrukturált mintával való lefedettsége (loading) hogyan befolyásolják a kialakuló nano-oszlopok sűrűségét, és magasságát?
- A nanostrukturált felületekre platinaréteg leválasztásával kialakított elektromos kontaktusoknak milyen mértékben növekszik a fajlagos felülete a sík felülethez képest?

#### 4.1.1. Az elkészült nanostruktúrák morfológiájának gyártási paramétereiktől való függése

##### 4.1.1.1. Az $O_2$ térfogatáram változásának hatása

Az  $O_2$  térfogatáramának a passzíváló réteg kialakulásában van fő szerepe szilícium kriogén  $SF_6/O_2$  plazmamarása esetén [192]. Mivel a passzíváló réteg az oldalfalakat is védi, így szerepe van a marás anizotrópiájában is. Méréseinkben konstans  $SF_6$  térfogatáram mellett kétféle  $O_2$  térfogatáramnál vizsgáltuk a kialakuló struktúrák morfológiáját. Az eredményeket a 6. táblázat, és a 10. ábra mutatják. A 11. ábrán az elkészült minták reprezentatív SEM felvételei láthatók. A marások esetében a közös paraméterek az alábbiak voltak:  $T=-110\text{ °C}$ ;  $P_{RF}=2\text{ W}$ ;  $P_{ICP}=700\text{ W}$ , marási idő: 1 perc.

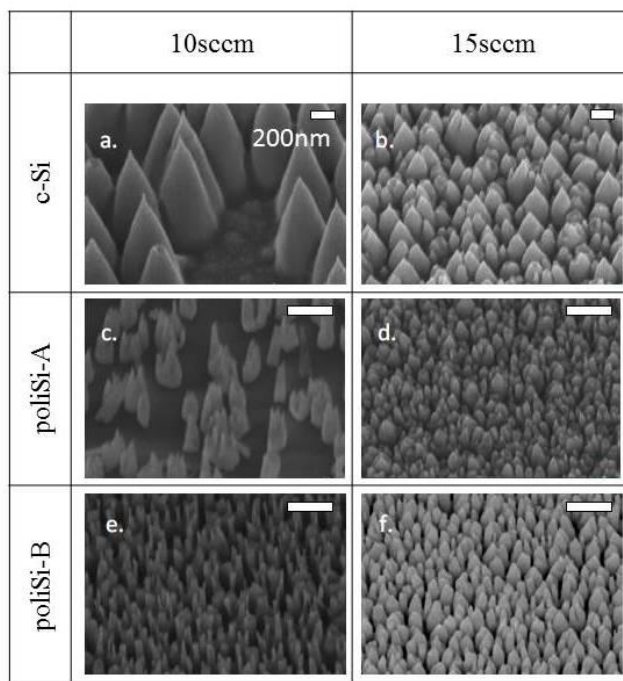
Minta	O <sub>2</sub> térfogatáram [sccm]	Oszlopsűrűség [db/μm <sup>2</sup> ]	Oszlopmagasság [nm]
c-Si	10	2,4±0,6	1973±131
	15	22,14±6,7	690±76
poliSi-A	10	9,4±2,2	783±116
	15	39,3±13	422±130
poliSi-B	10	47,3±5,3	482±13
	15	71,7±14	355±6

6. táblázat Nanostruktúrák morfológiai paramétereit különböző O<sub>2</sub> térfogatáramoknál

10. ábra O<sub>2</sub> térfogatáram változásának hatása a kialakuló nanostruktúrák oszlopsűrűségére és magasságára. A diagram a vizsgált minták oszlopsűrűségének és magasságának átlagát és szórását mutatja. Állandó SF<sub>6</sub> térfogatáram mellett növelt O<sub>2</sub> térfogatáram hatására nőtt a kialakuló nanostruktúrák sűrűsége mindhárom minta esetében. Az egykristályos Si minta esetében az oszlopmagasság szignifikáns csökkenése figyelhető meg, ahogy a térfogatáram 10 sccm-ről 15 sccm-re nő, a polikristályos Si minták esetében is megfigyelhető a magasság-csökkenés, de nem olyan jelentős mértékű, mint a c-Si felület esetében. A poliSi-B minta mindkét morfológiai jegy esetében kevésbé érzékeny az O<sub>2</sub> térfogatáram változásra, mint a másik két minta.

Az SF<sub>6</sub>/O<sub>2</sub> térfogatáram arány növelésével (vagyis konstans SF<sub>6</sub> térfogatáram mellett alacsonyabb O<sub>2</sub> térfogatárammal) a c-Si felület esetében csökken az oszlopsűrűség és nő a marási sebesség a polikristályos mintákkal szemben. A poliSi-B minta esetében mindkét morfológiai paraméter kevésbé érzékeny az O<sub>2</sub> térfogatáram változására, és az oszlopmagasság jelentősen kisebb szórást mutat, mint a poliSi-A, vagy a c-Si minta esetében. Ez valószínűleg a kiegyensúlyozott (110) és (100) orientációjú szemcsearánytal magyarázható.





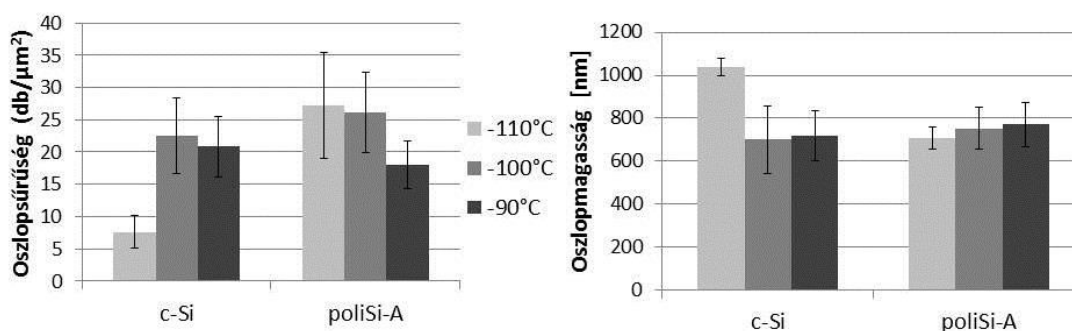
**11. ábra** Nanostruktúrák morfológiájának az O<sub>2</sub> térfogatáramtól való függése; reprezentatív SEM felvételek. A skála minden kép estében 200 nm-t mutat. A felvételek 30°-os tárgyasztal dőlésszögben készültek.

#### 4.1.1.2. A marási hőmérséklet hatása

A mintatartó és a szelet hőmérséklete a SiF<sub>x</sub>O<sub>y</sub> réteg felépülési sebességéért felelős [193]. Méréseinkben úgy találtuk, hogy a -90 °C és -115 °C közti hőmérséklet megfelelő a vertikális nanostruktúrák kialakulásához. Kísérletünkben három hőmérsékleti érték hatását vizsgáltuk a kialakuló nanostruktúrák morfológiájára. Az eredményeket a 7. táblázat, és a 12. ábra tartalmazza. Az elkészült minták reprezentatív SEM felvételei a 13. ábrán láthatók. A marások esetében a közös paraméterek az alábbiak voltak: O<sub>2</sub> térfogatáram=15 sccm; P<sub>RF</sub>=3 W; P<sub>ICP</sub>=700 W, marási idő= 1 perc.

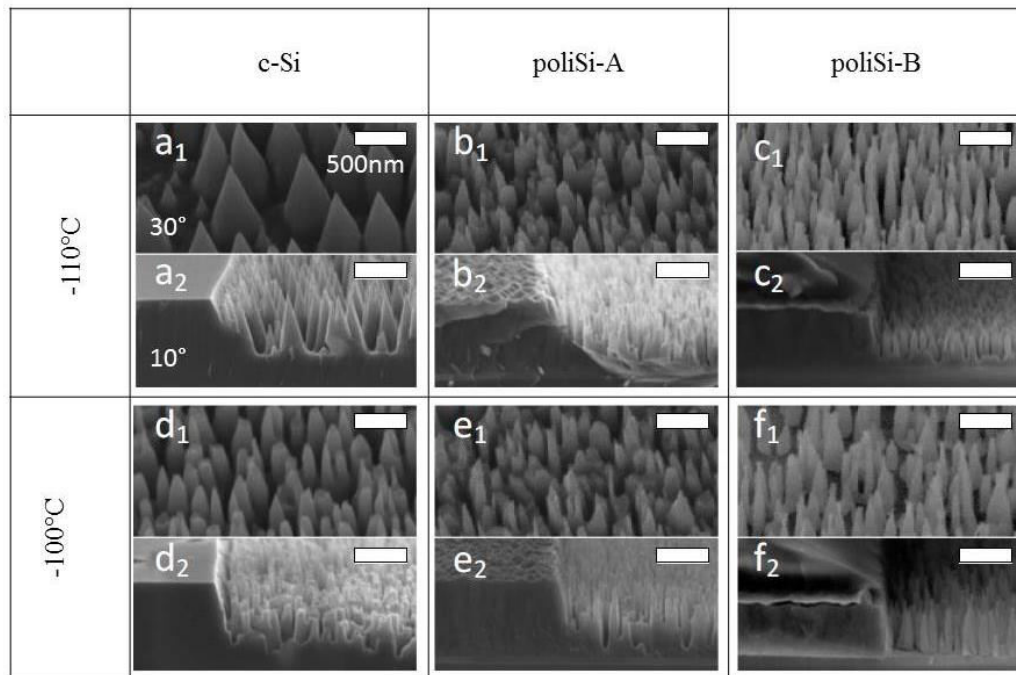
Minta	Szelethőmérséklet [°C]	Oszlopsűrűség [db/μm <sup>2</sup> ]	Oszlopmagasság [nm]
c-Si	-110°C	7,6±2,5	1039±39
	-100°C	22,5±5,9	700±157
	-90°C	20,8±4,7	719±116
poliSi-A	-110°C	27,2±8,2	708±50
	-100°C	26,1±6,2	752±97
	-90°C	18±3,7	770±102

7. táblázat Az elkészült nanostruktúrák morfológiai paramétereit különböző szelethőmérsékletek esetén



12. ábra Szelethőmérséklet változásának hatása a kialakuló nanostruktúrák oszlopsűrűségére és magasságára. A diagram a vizsgált minták oszlopsűrűségének és magasságának átlagát és szórását mutatja. A c-Si minták esetében mind az oszlopsűrűség mind az oszlopmagasság esetében szignifikáns változás figyelhető meg a marási hőmérséklet -90 °C -ról -100 °C -ra történő változásával.

Ahogy a hőmérséklet növekszik, a polikristályos minták esetében enyhe mértékű oszlopszám csökkenés figyelhető meg, míg az oszlopmagasság nem változik. Ezzel szemben a c-Si minta nagyon érzékeny a hőmérsékletváltozásra, mind az oszlopsűrűség, mind az oszlopmagasság markánsan változik -100°C-nél a -90°C esethez képest.



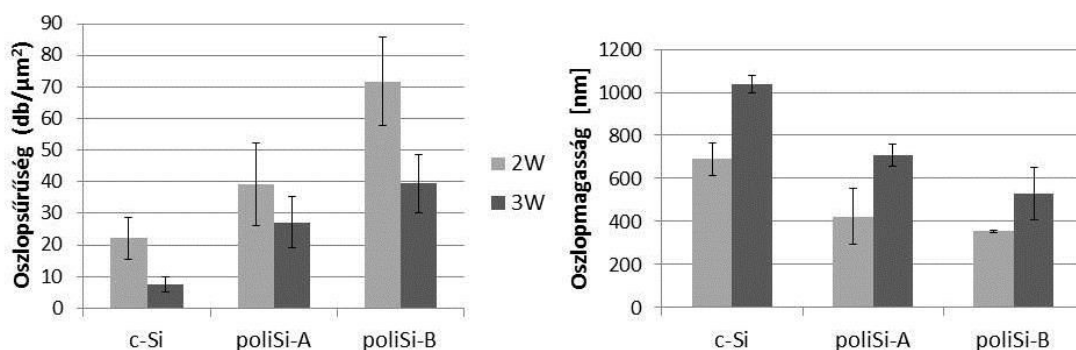
13. ábra Nanostruktúrák morfológiájának a marás hőmérsékletétől való függése; reprezentatív SEM felvételek. Az 1-es indexű felvételek 30°-os, a 2-es indexűek 10°-os mintatartó asztal dőlésszögben készültek. A skála minden esetben 500 nm-t mutat.

#### 4.1.1.3. Az RF előfeszítés teljesítményének hatása

Az RF teljesítménynek a plazmamarás fizikai komponensében van fő szerepe az ionenergia kontrollálásán keresztül. Az ionenergia növekedésével az anizotrópia növekedése, vagyis a hibahely sűrűség csökkenése, és gyorsabb marási sebesség várható. A kétféle vizsgált RF teljesítménnyel mart minták morfológiai paraméterei a 8. táblázatban, és a 14. ábrán láthatóak. A 15. ábra a poliSi-B kiindulási rétegből készült nanostruktúrák reprezentatív SEM felvételeit ábrázolja. A marások esetében a közös paraméterek az alábbiak voltak: SF<sub>6</sub> térfogatáram=40 sccm; O<sub>2</sub> térfogatáram=15 sccm; T=-110 °C; P<sub>ICP</sub>=700 W, marási idő= 1 perc.

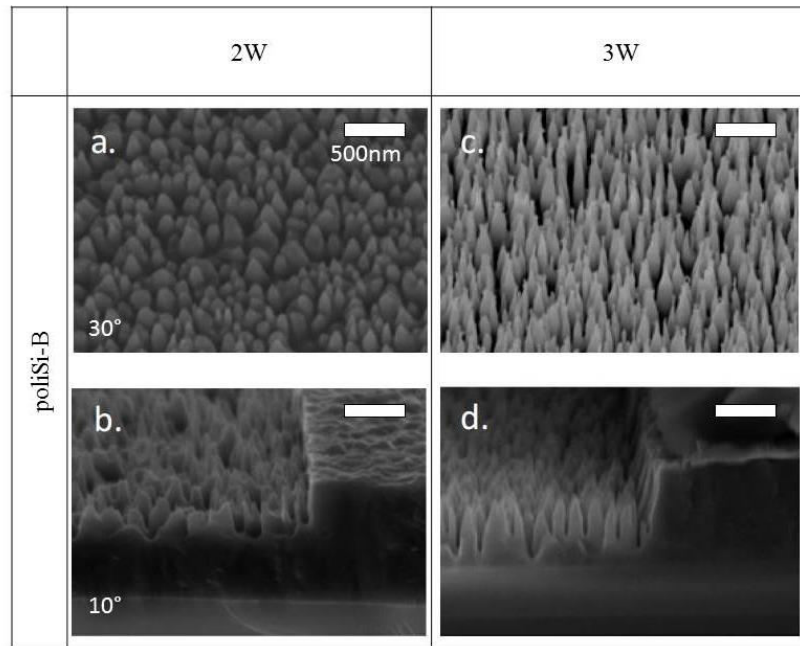
Minta	RF előfeszítés [W]	Oszlopsűrűség [db/ $\mu\text{m}^2$ ]	Oszlopmagasság [nm]
c-Si	2	22,1 $\pm$ 6,7	690 $\pm$ 76
	3	7,6 $\pm$ 2,5	1039 $\pm$ 39
poliSi-A	2	39,3 $\pm$ 13	422 $\pm$ 130
	3	27,2 $\pm$ 8,2	708 $\pm$ 50
poliSi-B	2	71,7 $\pm$ 14	355 $\pm$ 6
	3	39,4 $\pm$ 9,1	528 $\pm$ 121

8. táblázat Az elkészült nanostruktúrák morfológiai paramétereit különböző RF előfeszítések alkalmazásánál



14. ábra A nanostruktúrák morfológiai paramétereinek RF előfeszítéstől való függése. A diagram a vizsgált minták oszlopsűrűségének és magasságának átlagát és szórását mutatja. Az RF teljesítmény növelésével csökkent az oszlopsűrűség mindhárom minta esetében, mely az irodalmi adatokkal összhangban áll. Az oszlopsűrűség csökkenés mértéke a polikristályos Si szemcseméretével is összefügghet.

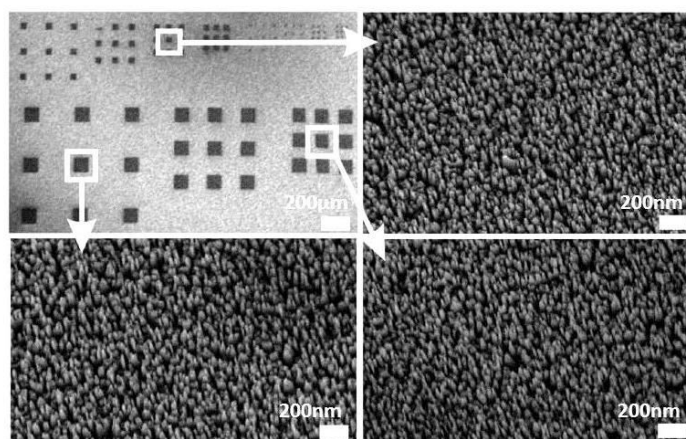
Az RF teljesítmény 2 W-ról 3 W-ra változtatásával csökkent az oszlopsűrűség mindhárom minta esetében, mely az irodalommal összhangban áll [162], [194]. A polikristályos Si minták esetében azonban a csökkenés nem olyan nagymértékű, mint a c-Si minta esetében. Valószínűleg a szemcseméret is hatással van erre a jelenségre, de azt is meg kell jegyezni, hogy kísérleteinkben a poliSi réteg alatt SiO<sub>2</sub> réteg helyezkedik el, melynek az ionbombázás következtében másodlagos töltődési hatása lehet, különösen, ahogy a marás megközelíti ezt a réteget.



15. ábra PoliSi-B kiindulási rétegből készült nanostruktúrák morfológiájának az RF előfeszítéstől való függése; reprezentatív SEM felvételek. Az a. és c. felvételek 30°-os, a b. és d. felvételek 10°-os dőlésszögben készültek. A skála minden felvételen 500 nm-t mutat.

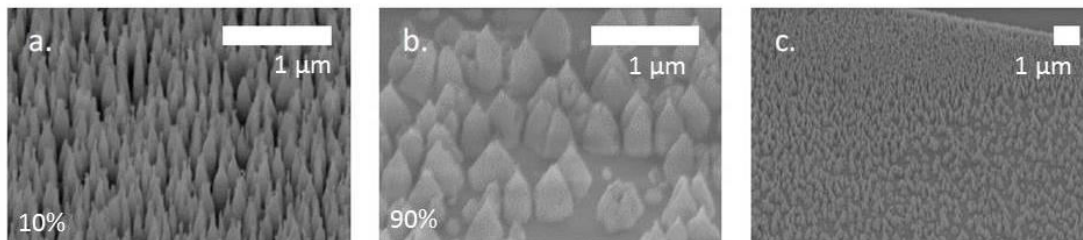
#### 4.1.1.4. A mintatelítettség változásának hatása

A lokális mintatelítettség hatását az elektródtervezés szempontjából nagyon fontos ismerni, mivel lehetséges, hogy ez befolyásolja a kialakuló nanostruktúrák morfológiájának egyenletességét, amit figyelembe kell venni a kontaktusok elhelyezésének és méretének tervezésében. Megfigyeléseink alapján a lokális mintatelítettség nem befolyásolta a kialakuló nanostrukturált felületek homogenitását (16. ábra).



16. ábra Lokális mintatelítettség hatása a kialakuló nanostrukturált felületek homogenitására. Megfigyeléseink alapján a lokális mintatelítettség változása nem okoz inhomogenitást a nanostruktúrák morfológiájában.

A teljes szelet nanostrukturálása azonban jelentős hatással van a felületek inhomogenitására. A lefedett terület növekedésével jelentősen nő a marási sebesség, és a szelet széle felé csökkenő tendencia figyelhető meg a kialakuló oszlopok sűrűségében. Megfigyeléseinket a 17. ábrán látható SEM felvételek is reprezentálják.



17. ábra A teljes szelet nanostrukturált mintával való fedettségi arányának befolyása a kialakuló nanostrukturák morfológiájára. Az a. ábrán 10%-os lefedettség esetén, a b. ábrán 90%-os lefedettség esetén kialakult nanostrukturák láthatóak, azonos marási paraméterek mellett. A c. ábrán a nagyfelületű minta széle felé haladva megfigyelhető gradiens látható. A marási paraméterek a következők voltak:  $SF_6$  térfogatáram=40 sccm;  $O_2$  térfogatáram=15 sccm;  $T=-110\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $P_{RF}=3\text{ W}$ ;  $P_{ICP}=700\text{ W}$ , marási idő=1 perc.

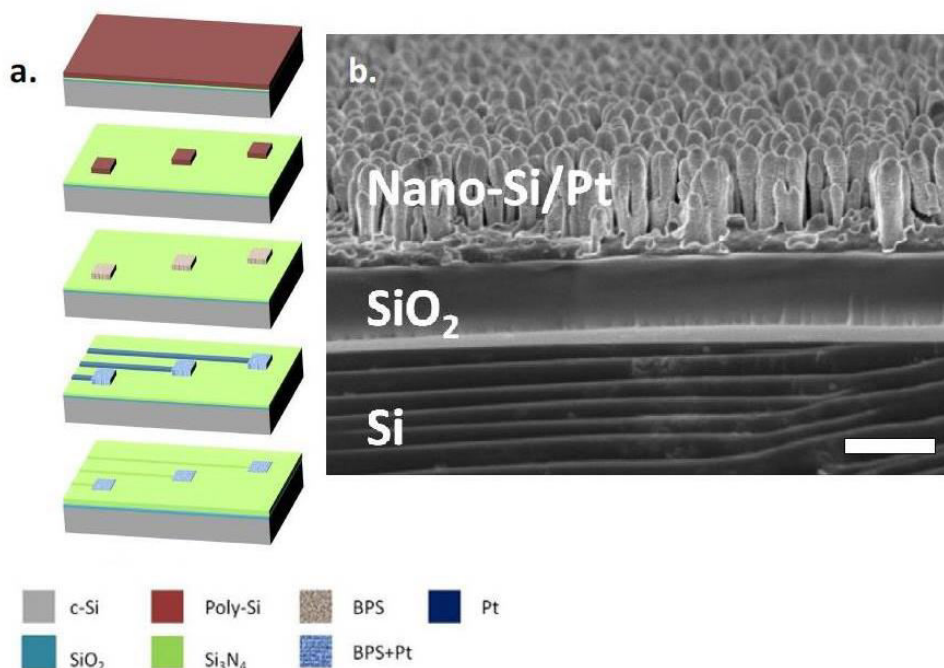
Megállapítottam, hogy a fekete szilícium nanostrukturák átlagos oszlopmagassága és oszlopsűrűsége a marás paramétereinek változtatásával az alábbiak szerint hangolható. Az egykristályos szilícium minták esetében a vizsgált marási paraméterek mellett az oszlopmagasság  $690\text{ nm}\pm 76\text{ nm}$  és  $1973\text{ nm}\pm 131\text{ nm}$  közé, az oszlopsűrűség pedig  $7,6\pm 2,5\text{ db}/\mu\text{m}^2$  és  $22,5\pm 5,9\text{ db}/\mu\text{m}^2$  közé esik. A polikristályos szilícium minták esetében,  $1\text{ }\mu\text{m}$  vastag rétegből kiindulva az oszlopmagasság  $355\text{ nm}\pm 6\text{ nm}$  és  $783\text{ nm}\pm 116\text{ nm}$  közé esik, az oszlopsűrűség pedig  $9,4\pm 2,2\text{ db}/\mu\text{m}^2$  és  $71,7\pm 14\text{ db}/\mu\text{m}^2$  közt változik. A kiindulási polikristályos Si réteg leválasztási hőmérsékletétől jelentősen függ az  $O_2$  térfogatáram változásának hatása a kialakuló nanostrukturák morfológiájára. A leválasztási hőmérséklet  $610\text{ }^\circ\text{C}$  -ról  $630\text{ }^\circ\text{C}$  -ra történő változásával a csökkenő  $O_2$  térfogatáram mindkét esetben oszlopsűrűség csökkenést és magasság növekedést eredményez, azonban a  $630\text{ }^\circ\text{C}$ -n leválasztott minta esetében mindkét változás jelentősen kisebb mértékű, vagyis ez a kiindulási felület kevésbé érzékeny e paraméter változtatására.

#### 4.1.2. Fajlagos felületnövekedés

A kialakított nanostrukturák kontaktusfelületként való felhasználásához vezetőréteg bevonatra van szükség. Az idegi implantátumok esetében a platina gyakran használt kontaktusfelület, eszközeinken általában mi is ezt az anyagot használjuk. A 18. a. ábrán a nanostrukturált, platínával bevont kontaktusfelületek kialakításának sematikus ábrája látható, a b. képen

porlasztott platinaréteggel bevont nanostrukturált felszín keresztmetszetének pásztázó elektronmikroszkópos felvétele látható.

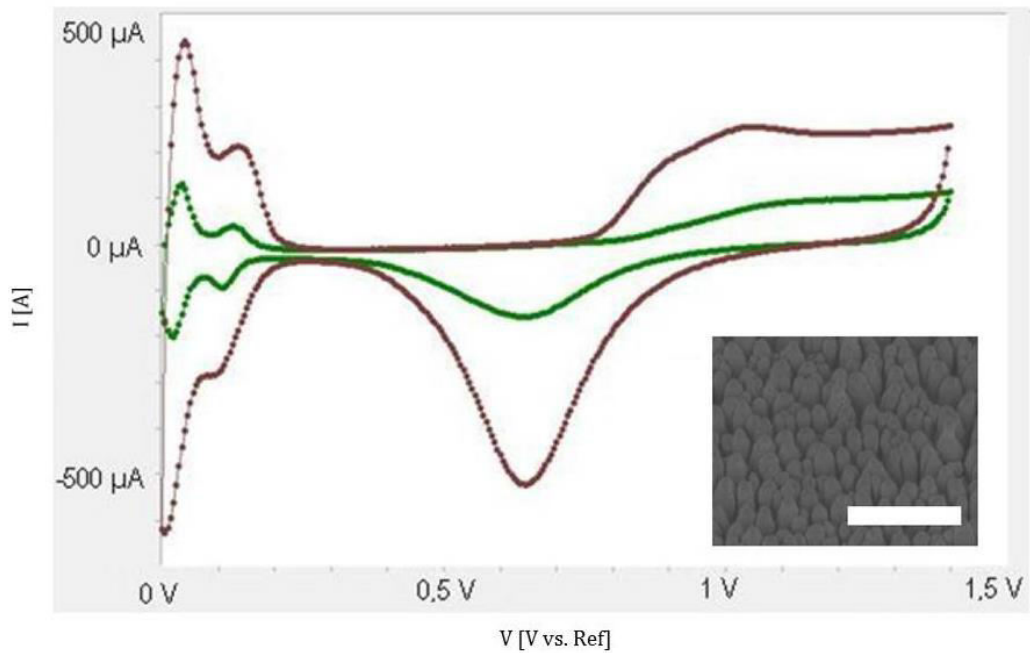
A nanostrukturált réteget 15 nm Ti tapadóréteg porlasztása után 100 nm porlasztott Pt réteggel vontuk be. A kialakult felületeket CV és EIS mérésekkel elemeztük. Referenciaként szintén 15 nm Ti, és 100 nm Pt réteggel bevont SiO<sub>2</sub> mintát használtunk. A ciklikus voltammetriás méréssel a multiréteg fajlagos felületét becsültük meg, az elektrokémiai impedancia spektroszkópia segítségével a kialakult felület impedancia csökkenése állapítható meg a referenciafelülethez képest.



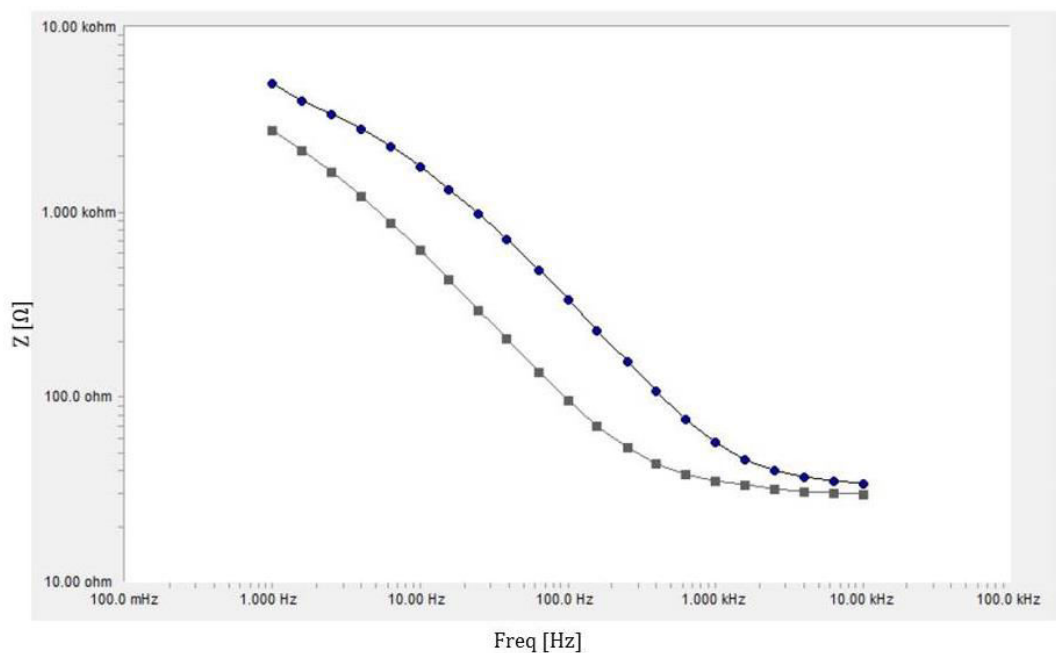
18. ábra a. Agyi elektródon található nanostrukturált, platinázott kontaktusok készítésének sematikus ábrája. (A Si szeletre szigetelő SiO<sub>2</sub>/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> réteg kerül, majd LCPVD-vel a polikristályos Si réteg. Ezt a réteget fotolitográfiával mintázzuk, és nedves marással alakítjuk ki a kontaktusok helyét. A mikrostrukturált felszínen megy végbe a fekete szilícium nanostrukturák DRIE marása. Ezekre, és a vezetékek helyére kerül a 15nm Ti, majd 100nm Pt réteg porlasztással, fotolitográfiával és lift-off eljárással. A vezetékezés szigetelésére Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> LPCVD-vel leválasztott réteg szolgál, ezt követi a kontaktusablakok nyitása.) A b. ábrán egy 15 nm Ti/100 nm Pt réteggel bevont nanostrukturált felület keresztmetszeti képe látszik, mely a következő marási paraméterekkel készült: SF<sub>6</sub> térfogatáram=40 sccm; O<sub>2</sub> térfogatáram=15 sccm; T=-100 °C; P<sub>RF</sub>=3 W; P<sub>ICP</sub>=700 W, marási idő= 1 perc. A méretskála 500 μm-t mutat.

A nanostrukturált, platínával bevont felület egy reprezentatív CV görbéje a 19. ábrán, EIS mérésének reprezentatív grafikonja a 20. ábrán látható. A különféle marási paraméterekkel készült, majd platínával bevont minták fajlagos felületnövekedését a 9. táblázatban foglaltam össze. Az itt felhasznált minden minta 630 °C-n leválasztott polikristályos Si kiindulási réteggel készült. A legnagyobb mértékű felületnövekedés, melyet elértünk, 44x-es volt a referencia felszínhez képest.



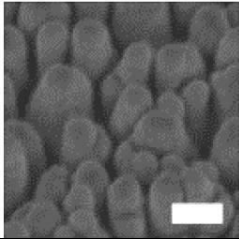
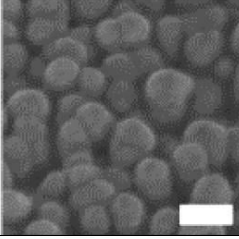
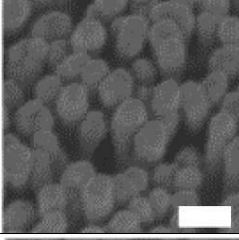
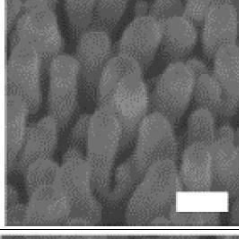
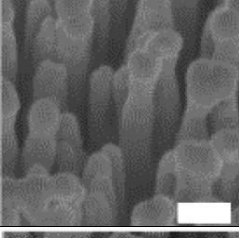
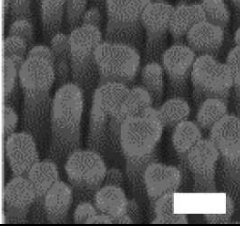


19. ábra Nanostrukturált, 15 nm Ti/100 nm Pt réteggel bevont elektród (SEM felvétel a jobb alsó sarokban, skála:  $1\ \mu\text{m}$ ) reprezentatív CV görbéje (barna) és a referencia felület CV görbéje (zöld). A görbék által határolt terület növekedése a fajlagos felületnövekedést reprezentálja. A struktúra a következő marási paraméterekkel készült:  $\text{SF}_6$  térfogatáram= $40\ \text{sccm}$ ;  $\text{O}_2$  térfogatáram= $20\ \text{sccm}$ ;  $T=-90\ ^\circ\text{C}$ ;  $P_{\text{RF}}=2\ \text{W}$ ;  $P_{\text{ICP}}=700\ \text{W}$ , marási idő= $1\ \text{perc}$ .



20. ábra 15 nm Ti/100 nm Pt réteggel bevont nanostrukturált felület (szürke, négyzet alakú pontok), és azonos fémezéssel ellátott  $\text{SiO}_2$  referenciafelület (kék, kör alakú pontok) reprezentatív EIS görbéi. A nanostrukturált alaprétegű elektród impedanciája a vizsgált, széles frekvenciatartományon mindenhol alacsonyabb a referenciaértékeknél. A nanostruktúra a következő marási paraméterekkel készült:  $\text{SF}_6$  térfogatáram= $40\ \text{sccm}$ ;  $\text{O}_2$  térfogatáram= $15\ \text{sccm}$ ;  $T=-90\ ^\circ\text{C}$ ;  $P_{\text{RF}}=2\ \text{W}$ ;  $P_{\text{ICP}}=700\ \text{W}$ , marási idő= $1\ \text{perc}$ .



O <sub>2</sub> térfogatáram [sccm]	Hőmérséklet [°C]	RF teljesítmény [W]	SEM felvétel	Fajlagos felületnövekedés a referenciához képest
10	-110	1		7,83
15	-110	2		12,13
15	-90	2		18,55
10	-110	2		26,17
15	-100	3		33,04
15	-110	3		44,2

9. táblázat A különféle marási paraméterekkel készült 15 nm Ti/100 nm Pt felülettel bevont minták fajlagos felületnövekedése a referenciafelszínhez képest. A skála a SEM felvételeken 100 nm.

**Megmutattam, hogy a fekete szilícium nanostruktúrák kialakítása az agyba implantálható multielektrodok gyártási sorába illeszthető, és fém réteggel bevonva (15 nm Ti, 100 nm Pt) kontaktusfelületként funkcionálhat. Továbbá a nanostruktúrák marási paramétereitől függően akár 44x-es fajlagos felületnövekedés is elérhető ezzel a módszerrel, mely által az elektrodok impedanciája csökkenthető.**

A fentiek alapján látható, hogy az egykristályos és a polikristályos szilíciumfelületen kialakítható fekete szilícium nanostruktúrák morfológiája a marás paramétereinek változtatásával hangolható.

Méréseink alapján a marási sebesség esetünkben nem függ a lokális mintatelítettségtől az 1  $\mu\text{m}$  vastag polikristályos Si réteg esetében, vagyis a szenzoron történő kontaktuselrendezés ebből a szempontból tetszőleges lehet.

Látható, hogy a nanostrukturálási eljárás az implantálható agyi elektród gyártásának technológiai sorába illeszthető, és a nanostrukturált felszíneket platinaréteggel bevonva akár 44x-es fajlagos felületnövekedés is elérhető, mely által az elektromos kontaktusok impedanciája csökkenthető, így jobb jel/zaj viszonyt tehet lehetővé a biológiai mérésekhez.

## 4.2. Idegi őssejtek és immortalizált mikroglia sejtek *in vitro* vizsgálata

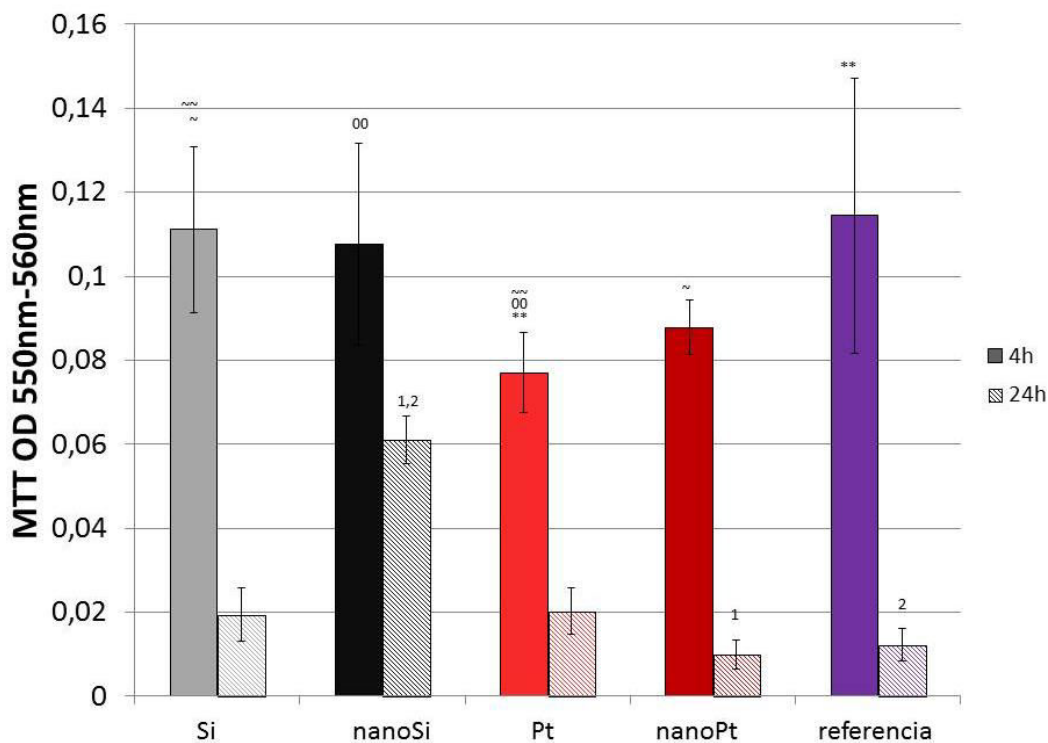
*In vitro* modellben teszteltük olyan nanostrukturált (70-110 darab oszlop/ $\mu\text{m}^2$ , átlagosan 600 nm magasság, random elhelyezkedés a felületen) és sima (100-200nm szemcseméret) szilícium és platina felületeket, melyek elkészítése egyszerűen integrálható agyszövetbe implantálható szilícium alapú eszközök gyártási sorába. Vizsgálatainkhoz a citoplazmájukban GFP-t expresszáló neuroektodermális őssejteket (GFP NE-4C) és immortalizált mikroglia sejteket (BV2) használtunk. Arra kerestük a választ, hogy

- a vizsgált felületek toxikusak-e erre a két sejt típusra nézve?
- a felületek anyagi minősége és topográfiája befolyásolja-e a sejtek tapadását és életképességét?
- idegi őssejtek képesek-e a vizsgált felületen neuronná differenciálódni?
- a vizsgált felületek hatással vannak-e a differenciálódásra és a differenciált tényezetek viselkedésére?

### 4.2.1. NE-4C és BV2 sejtek életképességének és letapadásának kvantitatív vizsgálata

Az MTT redukción tesztek alapján nem találtunk különbséget a sejtek letapadásában (4 órás vizsgálatok) a vizsgált szilícium felületek (Si, nanoSi), illetve az üveg referencia minta közt, de a platina bevonat jelentősen csökkentette a sejtek kezdeti letapadási készségét, függetlenül a felület topográfiájától.

A sejtszámok jelentős csökkenését figyelhettük meg 24 óra után a referencia felületen, és hasonló csökkenés történt a Si, Pt és nanoPt felületeken is. A 24 órás letapadási és életképesség vizsgálatok alapján a nanoSi felület biztosított az első 4 óra során letapadt NE-4C sejtek számára leginkább megfelelő felszínt a túléléshez, bár sejtszám csökkenés itt is megfigyelhető volt. Az eredményeket a 21. ábra mutatja.

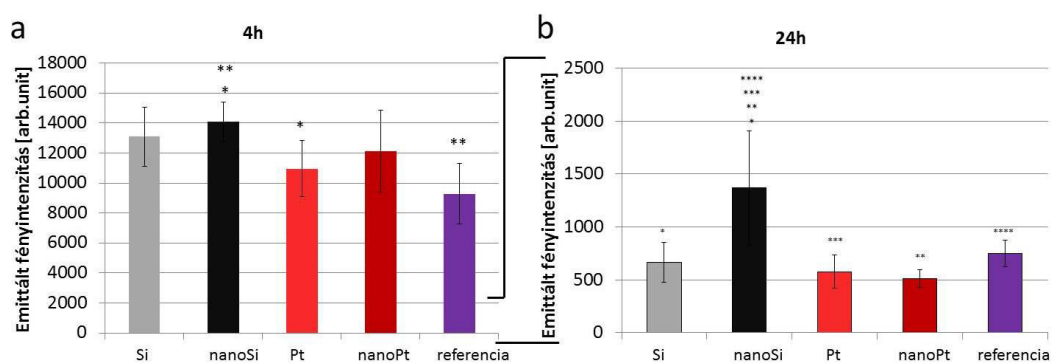


21. ábra NE-4C sejtek életképesség-vizsgálatának eredményei 4 h illetve 24 h inkubációs idő után MTT reduktív teszt felhasználásával mérve. A 4 órás mérés során szignifikáns különbséget ( $p < 0,05$ ) figyelhetünk meg a Si és nanoPt minták közt a Si javára. Szignifikánsan kevesebb sejtet figyelünk meg a Pt mintákon a Si, nanoSi és a referencia felületekhez képest.

A 24 órán át inkubált minták vizsgálata során azt figyelhetjük meg, hogy a letapadt sejtek jelentős része elpusztult. Ez a jelenség legkevésbé a nanoSi felületet érintette, melyen szignifikánsan több életképes sejtet mérhetünk mind a nanoPt, mind a referencia felülethez képest.

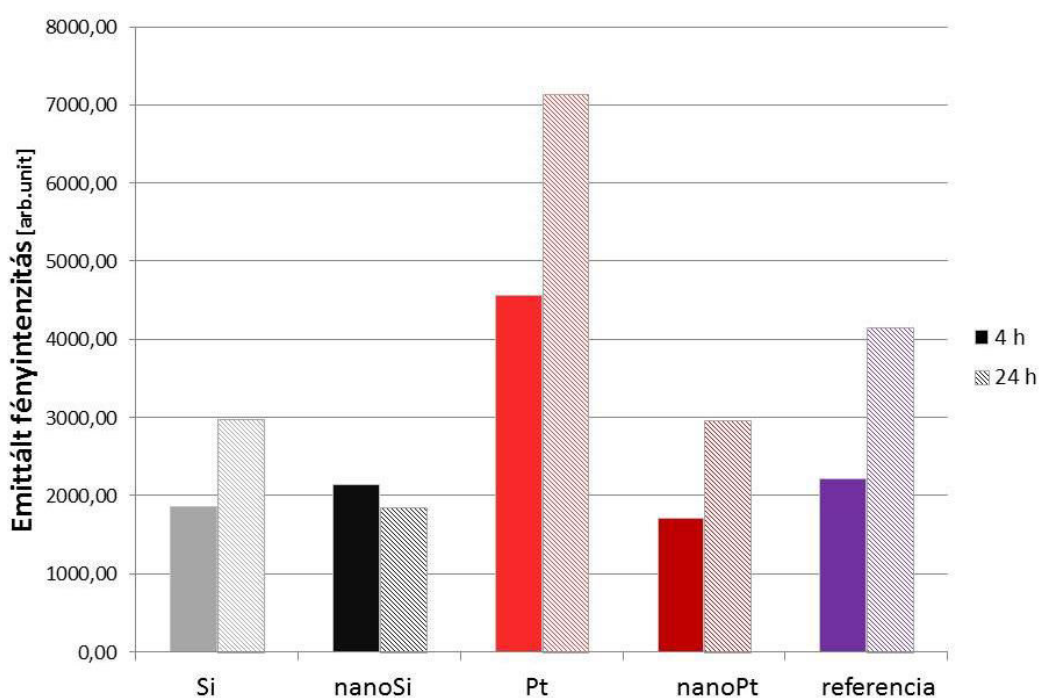
Az ábrán az oszlopok felett páronként azonos szimbólumok a  $p < 0,05$  szignifikancia szinten szignifikáns különbségeket reprezentálják.

Hasonló eredményeket kaptunk a sejtmagok fluoreszcens vizsgálatával (22. ábra).



22. ábra NE-4C sejtek letapadása (4 h) és túlélése a sejtmagokat festő DAPI fluoreszcencia-intenzitásának vizsgálatával, 4 h (a) illetve 24 h (b) inkubációs idő után. A 21. ábrán megfigyelhetőekhez hasonló eredményeket láthatunk. A 4 óra alatt letapadt sejteknél jelentősen alacsonyabb sejtszám mérhető a 24 órán át inkubált minták mindegyikének felszínén. A sejtszám csökkenés ezen vizsgálat alapján is a nanoSi mintát érintette legkevésbé, melyen szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) több sejt figyelhető meg, mint a másik négy vizsgált minta felületén.

A BV2 sejtek esetében a sejtmagok fotometriás mérése alapján nem találtunk különbséget a Si, nanoSi, nanoPt és a referencia minták közt, azonban a sima platina (Pt) felület javította a kezdeti (4 óra alatt lejátszódó) sejttapadást. A 24 órás inkubációs idő után jelentős sejtszám növekedést figyelhettünk meg mind a Si, mind a Pt és nanoPt felületeken. A BV2 sejtek legnagyobb számban a sima platina felületen tapadtak ki a négy felülettípus közül, a felület nanomintázottsága azonban némileg csökkenti ezt a jelenséget. Az eredmények a 23. ábrán láthatóak.



**23. ábra** BV2 sejtek 4 h illetve 24 h inkubációs idő alatt mért sejtmennyiségei a sejtmagot festő DAPI fluoreszcens intenzitása alapján. Az NE-4C sejtekkel szemben e sejtípus esetében nem figyelhető meg jelentős sejtszám csökkenés 24 óra után. Ezek a sejtek a platinafelületet részesítik leginkább előnyben, mely hatáson a nanostrukturáltság némileg ront.

A 4-órás inkubálás utáni metabolikus aktivitáson alapuló (MTT) és a sejtmaganyag mennyiségét vizsgáló (DAPI fluorometria) méréseink eredményei is azt mutatták, hogy a 300-1000 nm oszlopmagasság nagyságrendbe eső szilícium, illetve platina bevonatos nanostrukturák közvetlen toxikus hatást nem gyakorolnak sem a neuroektodermális őssejtekre sem az immortalizált mikroglia sejtekre.

Az NE-4C sejtek a sima felületű és nanostrukturált szilícium felületeken hasonló letapadási arányt mutattak, mint a bevonat nélküli üveg referencia felületeken. A platina felületeken, függetlenül a topográfiától kevesebb sejt maradt.

Ezzel ellentétben a BV2 sejtek nagyobb arányban tapadtak a platina felületekre a sejtmagfestéses mérések alapján, mely hatást a platina alatt elhelyezkedő nanostrukturák némileg csökkentettek. A sejtszám 4 óra után a Si, nanoSi és nanoPt felületeken az üveg referenciához hasonló volt.

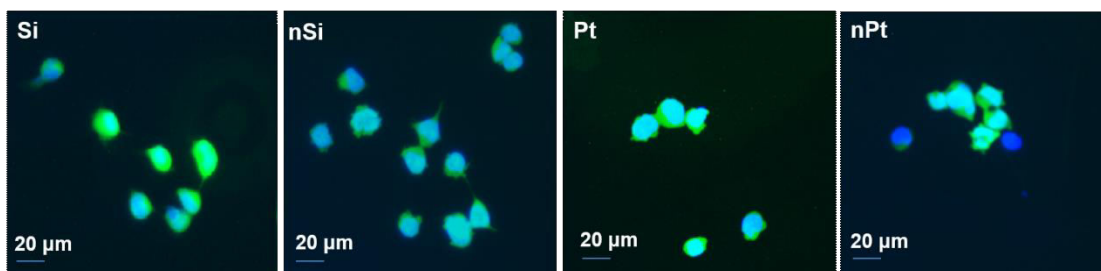
Bár a felületek nem toxikusak, mivel a sejtek egy hányada képes letapadni a felületeken, arra a következtetésre juthatunk, hogy a 4 órás kezdeti letapadási vizsgálatok alapján a vizsgált felszínek nem támogatják az NE-4C sejtek túlélését. Az NE-4C sejtek adhéziófüggő sejtek, olyan közegben képesek életben maradni és osztódni, ahol biztonságosan képesek tapadni. Megfelelő túlélés mellett, 24 óra inkubációs idő után a 4 órás sejtszám közel a kétszerese lett volna várható, a 20 órás duplikációs idővel szaporodó NE-4C sejtek esetén. Ezzel szemben a mért értékek a 4 órás vizsgálatok sejtszámai alá esettek.

Ezzel szemben a BV2 sejtek esetében a sejtszám nő. A sejtszámok növekedése a nanostrukturált szilíciumon a legesekélyebb, míg a platina bevonatú felületek jelentősen jobban támogatják e sejtípus letapadását és túlélését.

#### **4.2.2. Fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok eredményei**

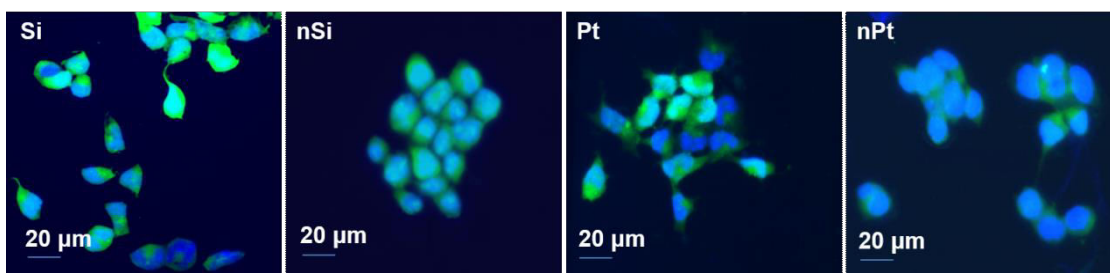
Fluoreszcens mikroszkópiás megfigyeléseink során a sejtek morfológiáját, és egymáshoz viszonyított elhelyezkedésüket, aggregálódásuk mértékét vizsgáltuk a különféle felületeken. A GFP fluoreszcencia segítségével (zöld) megfigyelhető a sejtek citoplazmája, és a filopodiumok. A BB fluoreszcenciájával (kék) a sejtmagok váltak láthatóvá.

Már a kezdeti letapadási vizsgálatok (4 h) után is megfigyelhető volt az NE-4C sejtek különböző viselkedése a különféle felületeken, ahogy ez a 24. ábrán látható. A Si és nanoSi felszínű mintákon kiterjedt citoplazmával és növekedő filopodiumokkal rendelkező, egészséges kinézetű sejteket figyelhettünk meg, míg a Pt és nanoPt felületeken a sejtek kevésbé voltak kiterjedtek, és elvértve figyelhettünk meg filopodiumot.



24. ábra NE-4C sejtek két csatornás fluoreszcens felvétele 4 órás inkubációs idő után a különféle felületeken (sejtplazma – zöld, sejtmag – kék). A Si és nanoSi felületeken a sejtek kiterültebbek, nyúlványaik láthatóak. Utóbbi felületen a kvantitatív mérésekkel összhangban, nagyobb sejtszám figyelhető meg. A platina felületeken a sejtek kerekednek, jobban aggregálódnak, ezeken a felvételeken nyúlványok nem jellemzőek. A sejtmagok DAPI jele helyenként élesebb.

24 óra elteltével a nanostrukturált felületeken a sejtek aggregátumait figyelhettük meg, ami arra utal, hogy a sejtek előnyben részesítik az egymáshoz való tapadást a felszínhez történő letapadásával szemben, feltehetőleg azért, mert a felszín a letapadásuk és ez által a túlélésük szempontjából nem megfelelő (25. ábra). Nem aggregátumban elhelyezkedő sejtek a sima Si felszínre voltak jellemzőek, így az is megfigyelhető, hogy a platinabevonat erősíti az aggregálódásra való hajlamot e sejtípus esetében.



25. ábra NE-4C sejtek két csatornás fluoreszcens felvétele 24 órás inkubációs idő után a különféle felületeken (sejtplazma – zöld, sejtmag – kék). A nanostrukturált felszíneken megfigyelhető sejt aggregátumok arra utalnak, hogy az osztódó sejtek inkább tapadnak az egymáshoz, mint a felülethez.

Ezek a megfigyelések alátámasztják a kvantitatív esszék megállapításait. A 4 óra után megfigyelhető sejtek a felületek közvetlenül nem toxikus voltát támasztják alá. Az NE-4C sejteknek, különösen a platina felületeken megfigyelhető aggregálódása egybecseng az MTT és DAPI fluoreszcenciás mérések eredményével, mely szerint a vizsgált felületek, és közülük is kiemelten a platina felületek nem támogatják e sejtípus tapadását.

**Beláttam, hogy a vizsgált felületek sem az NE-4C, sem a BV2 sejt típusra nem gyakorolnak közvetlen toxikus hatást.**

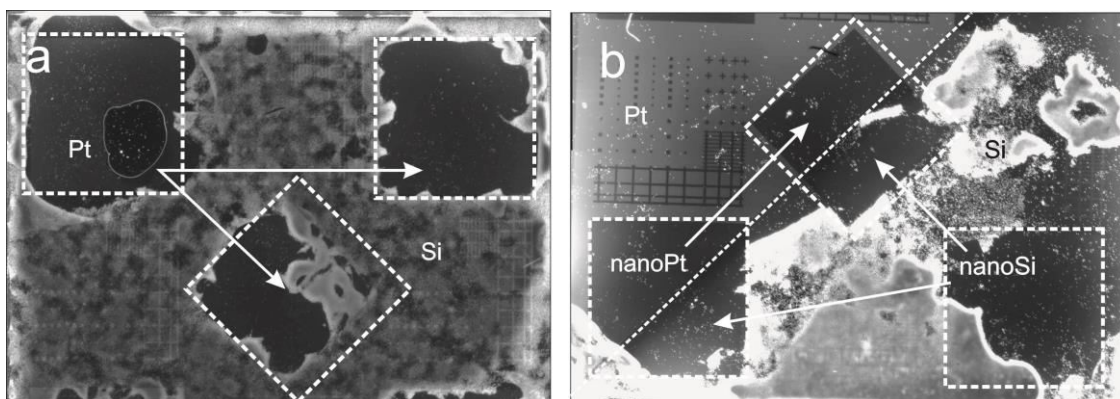
**Megállapítottam, hogy az NE-4C sejt vonal sejtjei 4 órás vizsgálat alatt a nanostrukturált szilícium és síkfelületű szilícium felületeket  $p=0,05$  szignifikancia szinten előnyben részesítik a platínával bevont felületekkel szemben. A sejtszámok 24 óra alatt jelentősen lecsökkennek, ami a sejtek igen gyenge tapadására utal. A legkisebb mértékű sejtszám csökkenést a vizsgált felületek közül a nanostrukturált szilícium felületen figyeltem meg.**

**Megállapítottam, hogy az immortalizált mikroglia (BV2) sejtek a négy vizsgált felületet tekintve a síkfelületű platinán a többi felülethez viszonyítva nagyobb számban tapadnak le.**

#### 4.2.3. *In vitro* idegsejtképződés vizsgálatainak eredményei

A sejtek kezdeti alacsony számban való túlélése miatt az indukciós vizsgálatokhoz a sejteket az előzőekhez képest nagyobb,  $2 \times 10^5$  sejt/cm<sup>2</sup> sejtszámban ültettük ki a felületekre. A tenyésztés folyamán a még élő tenyészeteken rövid fluoreszcens mikroszkópos megfigyelésekkel ellenőriztük, hogy növekszik-e a sejtszám, ennek során nagymértékű sejtaggregálódást láthattunk a tenyésztés 9. napjára.

A fixálás lépései során számos sejtaggregátum szabad szemmel is láthatóan levált a felszínről. Bár ez a jelenség minden mintán előfordult, leginkább a platínával fedett felületeket érintette, függetlenül a felszín topográfiájától (26. a. ábra). A nagyobb felületen összefüggő nanostrukturált területeken sikerült a legkevésbé fixálni a differenciálódott tenyészeteket (26. b. ábra).



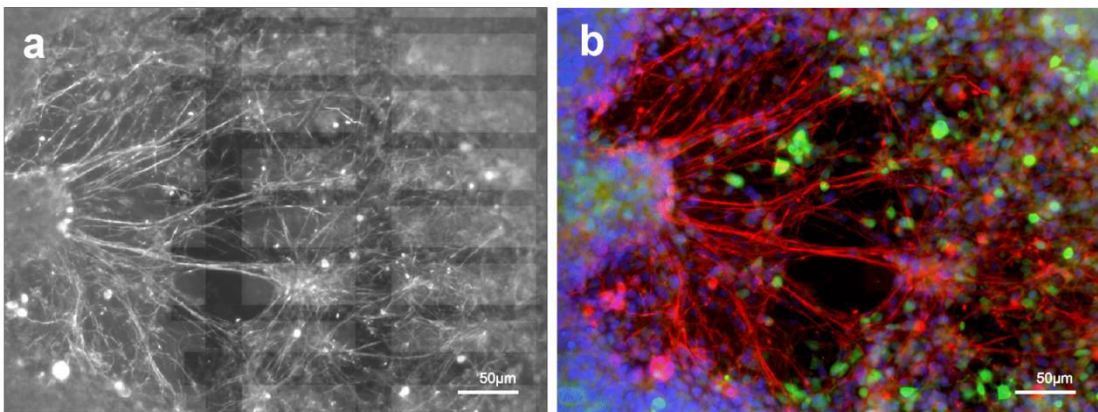
**26. ábra** Indukált tenyészetekről DAPI fluoreszcens jelet felhasználva készült mozaikfelvételek. Az a) ábrán a felületen a 3.2.1. fejezetben ismertetett mikro-mintázatban Si és Pt felületek váltakoznak. Jól látható, hogy a sejtek a nagyobb összefüggő platinafelületekről leváltak, míg a kisebb, 30-50  $\mu\text{m}$  tartományba eső mintázatoknál ez a jelenség nem figyelhető meg. A b) ábra alapján is arra következtethetünk, hogy a



**kialakult sejtészonyeg a platina felületre igen gyengén tapad, függetlenül annak morfológiájától. Ezen kívül azonban a szilícium felület nanostrukturáltsága is gyengíti a differenciált sejtek felülethez való tapadását.**

A fixálás után felületen maradt sejtek vizsgálata azt mutatta, hogy a leválás ellenére, jelentős mértékű neuron-differenciálódás történt a tenyészetekben. Vastag és több 100  $\mu\text{m}$  hosszúságú axonkötegeket figyeltünk meg, melyek sejtteste általában a sima felületű szilícium felszíneken helyezkedtek el, azonban a nyúlványok számos letapadási pontot létesítettek, és behálózták a nanostrukturált szilícium felszíneket is (27. ábra).

Ez azt jelezte, hogy hasonlóan kiterjedt neuronfejlődés mehetett végbe a platinával fedett felszíneken is. Az, hogy a „szövetszerű” sejt együttesek összefüggő sejtészonyegként leváltak, és nem lehetett a felszínre fixálni, arra enged következtetni, hogy a sejtek egymás közti tapadása jelentősen erősebb volt, mint a felszínhez való kötődés.



**27. ábra Indukált sejtek háromcsatornás fluoreszcens felvétele nanostrukturált tenyésztőlemez felszínén. Az a. ábrán látható a szilíciumlemez mintázata. A sötétebb színű rácszat nanostrukturált, míg a világosabb színű felületek sima felszínek. A b. ábrán a neuronná differenciálódott sejtek nyúlványai figyelhetők meg III $\beta$ -tubulin immunfestés (piros) után. A sejtplazma zöld, míg a sejtmagok kék fluoreszcens jelet adnak. Látható, hogy az idegsejtek sejtteste és magjai jellemzően a sima felületen helyezkednek el, azonban számos nyúlvány nő a nanostrukturált rács felett is.**

Annak megállapítására, hogy az in vitro körülmények közt differenciálódott sejtek különféle felületeken hogyan viselkednek, mutatnak-e anyag – illetve morfológia preferenciát, további kvantitatív mérések lennének szükségesek.

**Megállapítottam, hogy az NE-4C sejtek mind a négyféle felületen képesek retinsavas indukció mellett neuronná differenciálódni.**

Az eredmények alapján tehát a különféle felületek jelentős befolyással vannak az idegi eredetű sejtek életképességére és viselkedésére. A különböző felületek közt nagy különbség figyelhető meg a sejt-sejt és sejt-felület kölcsönhatások erősségét illetően.

Az idegrendszerben sérülés hatására gliális hegeképződés megy végbe. Ennek során a sérült idegsejteket az egészséges szövetből szeparálni igyekvő aktivált asztroglia sejtek és a folyamatban résztvevő mikroglia sejtek, valamint számos más faktor egy, a sejtek közt igen erős kölcsönhatásokkal bíró, a sérülés helyétől elszeparálódó szövetállományt hoz létre. Ez lesz a glia heg. Az indukált sejtek fixálása során tett megfigyeléseink hasonló jelenséget jeleztek: a képződött, idegsejteket is tartalmazó sejtállomány sejtjei egymáshoz erősen, a felülethez pedig nagyon gyengén kapcsolódnak. A vizsgált kísérleti körülmény tekinthető a hegeképződés egy kezdetleges *in vitro* modelljének. Ez alapján a platinafelület a biokompatibilitás, illetve az implantáció esetén elkerülhetetlen sérülést követő regeneráció szempontjából nem optimális választás, mivel ezeken a felszíneken fordul elő leginkább a szöveti szeparációt modellező folyamat.

Ezt alátámasztják a mikroglia sejtek modelljeként használt BV2 sejteket felhasználó kísérleteink eredményei is, melyekben a gliózis inicializációjában jelentős szerepet játszó mikroglia sejtek a platinafelületen tapadtak le nagyobb számban.

Ez a megfigyelés összhangban áll Ereifej és munkatársai munkájával is [195], akik asztrogliaik esetében fokozott reaktivitást figyeltek meg platinafelületeken.

Ugyanakkor a platina egyéb előnyös tulajdonságai miatt gyakran használt elektród alapanyag, nem toxikus, alacsony az impedanciája, jó a feszültség átviteli karakterisztikája és az agresszív szöveti környezet sem korrodálja. Bár a jobb jel/zaj viszony elérése érdekében az aktív kontaktusfelület növelése kézenfekvő megoldás lenne, ám ennek nanostrukturálással történő elérésekor figyelemmel kell lenni a platínával bevont nanostrukturált felület hosszú távú biokompatibilitásra gyakorolt, potenciálisan negatív hatására.

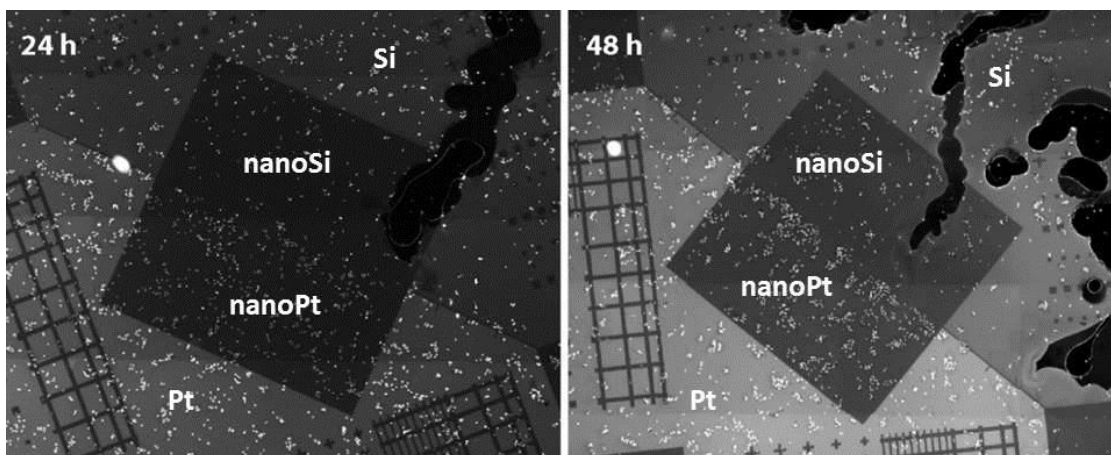
### 4.3. Primer asztroglia sejtek *in vitro* vizsgálata

A következő fejezetekben ismertetett mérések során primer asztroglia sejteket tenyésztettünk 24 h illetve 48 h inkubációs idővel a 3.2.1. fejezetben megismert, a 6. ábrán látható szilícium és platina sík (100-200 nm szemcseméretű polikristályos Si) és nanostrukturált (70-110 darab oszlop/ $\mu\text{m}^2$ , átlagosan 600 nm magasság, random elhelyezkedés a felületen) felületekkel rendelkező mintákon. A kísérletekkel a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Az asztroglia sejtek - mint a gliózisban főszerepet játszó sejtek - letapadását befolyásolja-e a felületek anyagi minősége és morfológiája, megfigyelhető-e sejtszámbeli különbség a különböző felületeket vizsgálva?
- A letapadt sejtek morfológiájából milyen tapadási és életképességi jellemzőkre következtethetünk a szilícium és a platina felületek esetén?
- A felületek nanostrukturáltsága befolyásolja-e a sejtek tapadási tulajdonságait?

#### 4.3.1. Sejtszámok alakulása a különféle felületeken

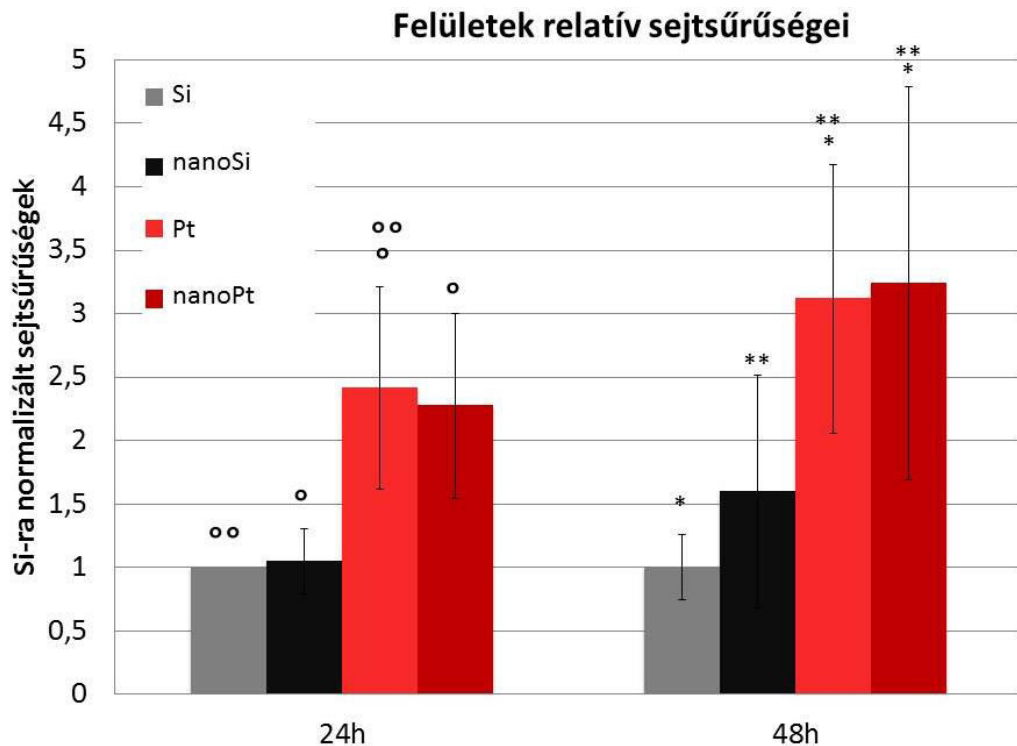
A mintákon mind 24 h, mind 48 h inkubáció után szembetűnő sejtszámbeli különbséget figyelhettünk meg a szilícium és a platina felszínek közt (28. ábra). A felszín nanostrukturáltsága látszólag nem volt hatással a sejtszámok alakulására.



28. ábra 24h és 48h inkubációs idővel készült minták DAPI csatornán mért, sejtmagokat ábrázoló, 10x nagyítású mozaikfelvételei. Mindkét esetben látványos a sejtszámbeli különbség a két anyag közt, és a platina felületen nagyobb a sejtszám. Ellenben a nanostrukturált felületek láthatóan nem befolyásolják a sejtszámok alakulását.

A meghatározott sejtsűrűségeket a Si felület sejtsűrűségéhez normálva a kvalitatívan is megfigyelhető eredményt kaptuk, mely a 29. ábrán látható. Mind 24 h, mind 48 h inkubációs idő alatt a platina felületeken a morfológiától függetlenül szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabb

volt a sejtsűrűség, mint a Si felületeken. Az azonos anyagú sima illetve nanostrukturált felületek közt nem találtunk szignifikáns különbséget. Nem mutatkozott jelentős különbség a sejtszámok 24 óra alatt történő változásában a négy féle felület közt, bár a platina felületeken nagyobb mértékű a 24 óra alatt bekövetkezett sejtszám növekedés, a szilícium felületekhez viszonyítva.



29. ábra A szilícium felületeken 24 illetve 48 órán keresztül inkubált primer asztroglia tenyészetek sejtsűrűségeihez normált sejtsűrűségeket a négy vizsgált felületen. Mind a 24 h, mind a 48 h inkubációs idővel készült tenyészetek esetén szignifikáns a sejtsűrűség különbség a szilícium és a platina felületek közt ( $p < 0,05$ ), míg a Si/nanoSi, és Pt/nanoPt felületek közt egyik esetben sem figyelhető meg ez a jelenség.

A fenti eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a szilícium felületek a platinához képest kevésbé támogatják a primer asztroglia sejtek letapadását. A sejtszám növekedés különbsége arra utalhat, hogy a letapadt sejtek is kevésbé erősen kötődnek a Si felületekhez, emiatt nem képesek megfelelő arányban osztódásra, a felület a sejtekre apoptotikus hatással lehet. Ennek megerősítésére azonban további vizsgálatok szükségesek. A fenti eredmények alapján a felületi morfológia nem befolyásolja jelentős mértékben a primer asztroglia sejtek letapadását és életképességét.

**Megállapítottam, hogy a primer asztroglia sejtek a szilíciumfelülethez viszonyítva nagyobb számban tapadnak le és élnek túl a platinafelületeken, a felületi topográfiától függetlenül  $p=0,05$  szignifikancia szinten.**

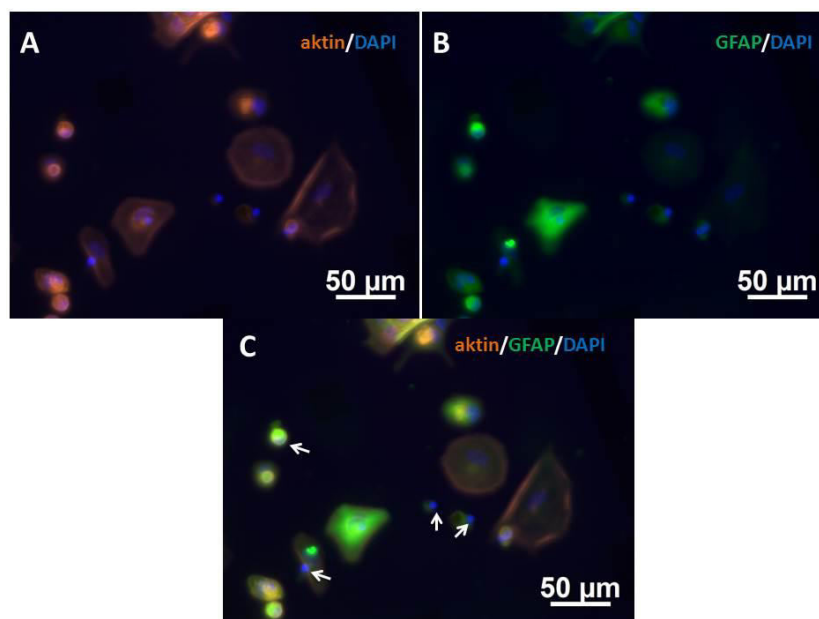
#### 4.3.2. A sejtek morfológiája a különféle felületeken

A primer tenyészetek egyedi sejtjeinek morfológiáját 20x illetve 40x nagyítású fluoreszcens mikroszkópiás felvételeken vizsgáltuk, három csatornán (GFAP filamentumok – zöld, aktin filamentumok – narancs, sejtmagok –kék). A sejtek felszínét nagy nagyítású pásztázó elektronmikroszkópos képek alapján elemeztük. Figyeltük a sejtek méretét, alakját, felszíni motívumaikat, a sejtmagok méretét, alakját, és hogy az egyes felszíneken milyen tapadásra utaló jeleket látunk, valamint hogy a sejtek egymással milyen kapcsolatokat képeznek.

A 24, illetve 48 órás inkubációs idővel készített tenyészetek közt a morfológiát tekintve lényegi különbségek nem figyelhetők meg, így ezeket a továbbiakban nem különböztetem meg.

#### Szilícium felületeken elhelyezkedő sejtek morfológiája

A szilícium felületeken gyakran figyelhetőek meg különálló sejtek, melyek az átlagosnál kisebb méretűek. Az aktin és GFAP által megjelenített sejtvezeték tömör, intenzív fluoreszcens jel jellemzi. A sejtmagok általában szintén kicsik, és erős DAPI jelet adnak (30. ábra). A 2.4. fejezetben megfogalmazottak alapján ezek a jelek az apoptotizáló, nem jól tapadó sejtek jellemzői.

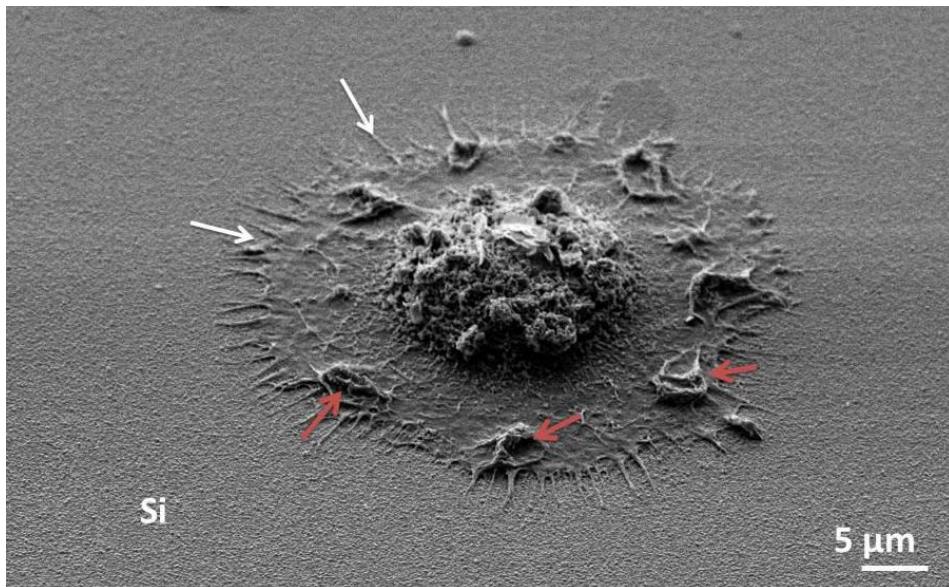


30. ábra Primer asztroglia sejtek tenyészete Si felületen. A: aktin filamentumok (narancs) és sejtmagvak (kék), B: GFAP filamentumok (zöld) és sejtmagok (kék), C: három csatornás felvétel. Megfigyelhetőek az erős DAPI jelet adó sejtmagok (C ábra, fehér nyilak), amely feltehetően apoptotikus sejtekre utal.

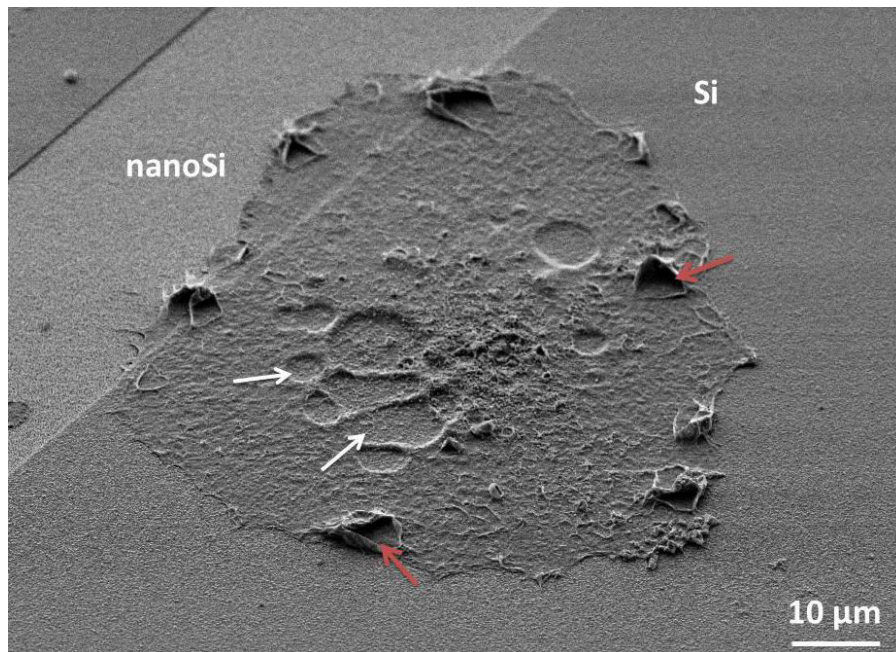
A SEM felvételek alapján is hasonló megfigyelések tehetőek. A sejtmag gyakran dombszerűen kiemelkedő, felszíne érdes (31. ábra), egyes esetekben megfigyelhető a sejtmag szétesése is



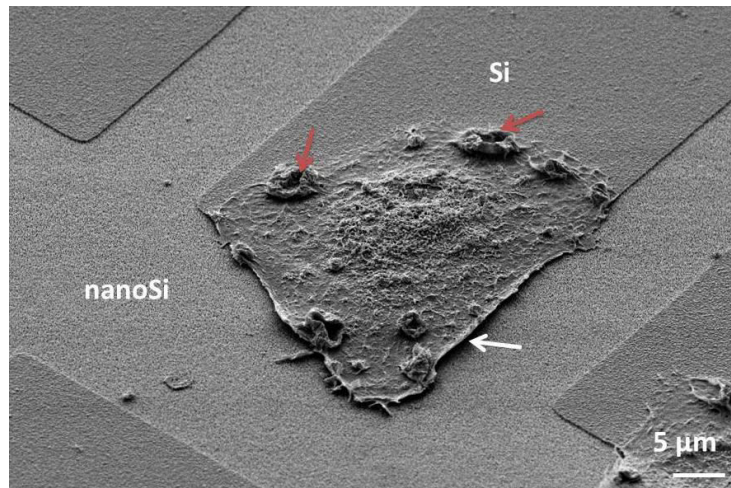
(32. ábra). A sejtfelszínen megfigyelhetők az úgynevezett blebek, melyek az apoptotikus sejtek jellemzői (31-33. ábrák).



31. ábra Szilícium felületen fixált primer asztroglia sejt. A sejtmag kidomborodik, felszíne érdes. A hosszú filopodiumok (fehér nyíl) a gyenge tapadásra utalnak. A piros nyíllal jelzett felszíni hólyagok (blebek) a pusztuló sejtek jellemző felületi motívumai.



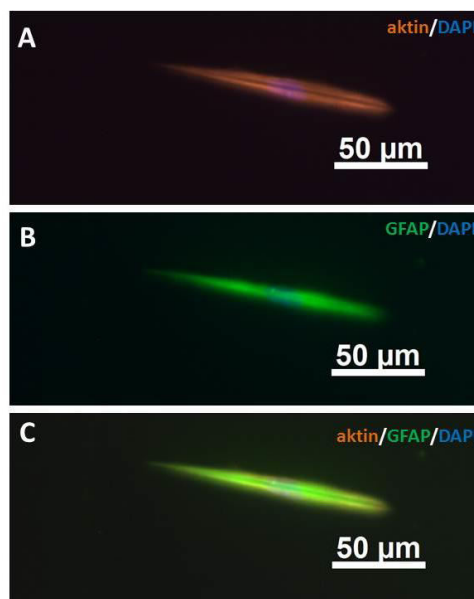
32. ábra Szilícium felszínen található asztroglia sejt. A fehér nyíl a széteső sejtmagra mutat. A sejtfelszínen blebek láthatóak (piros nyilak).



33. ábra Szilícium és nanostrukturált szilícium felület határán található primer asztroglia sejt. A piros nyilak blebekre mutatnak. A sejt a nanostrukturált felszínre nem tapad (fehér nyíl).

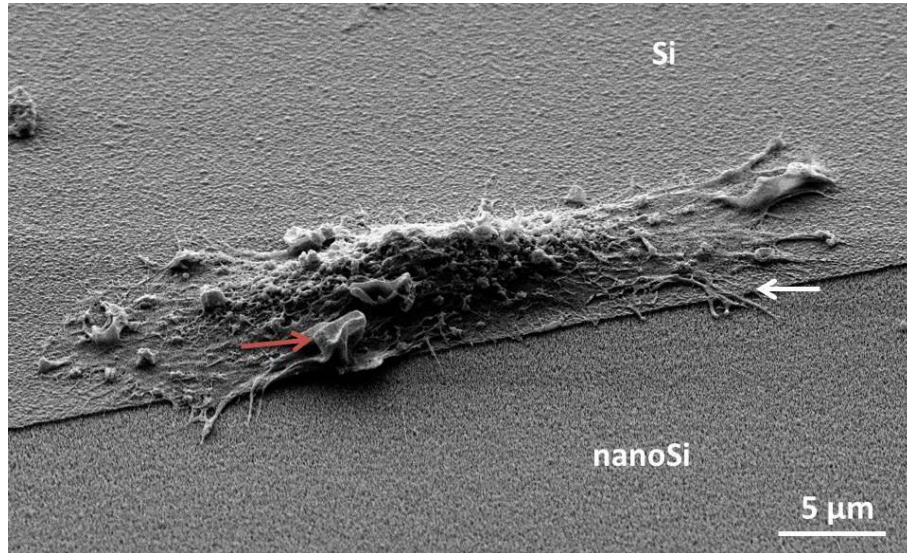
Ezek a rendellenes morfológiájú sejtek elszórtan az egész mintán megtalálhatóak, azonban jelenlétük a szilícium felületen hangsúlyosabb.

A tenyészetben egy egészséges, jól tapadó sejt minden irányban azonosan terjeszkedik, általában kerek, vagy ahhoz közel álló alakot vesz fel. Szintén a szilícium felszíneken figyelhettünk meg hosszúkas morfológiájú sejteket. Ez feltehetően szintén rendellenes letapadás eredménye, mivel a felületeken nem található hosszanti vezető struktúra. Ebben az esetben a fluoreszcens felvételen a sejtvázfehérjék tömötten, orsószerűen helyezkednek el, a sejtmag, feltehetően az erősen kondenzált kromatinállomány miatt igen fényes DAPI jelet ad (34. ábra).



34. ábra Erősen megnyúlt sejt fluoreszcens felvétele Si felületen. A sejtmag erős DAPI jelet ad. A: aktin filamentumok (narancs) és sejtmagok (kék), B: GFAP filamentumok (zöld) és sejtmagok (kék), C: három csatornás felvétel.

Azonban a SEM felvételek alapján nem teljesen kizárt, hogy ezek a sejtek általában a sima és nanostrukturált felszínek élei mentén vették fel ezt az alakot, ahogy a 35. ábrán is látható. Az ilyen alakú sejteken a SEM felvételeken szintén a gyengén tapadó sejtek jellemzőjeként, igen hosszú filopodiumok figyelhetők meg. A felszínükön gyakori a sejthalálra utaló blebesedés.



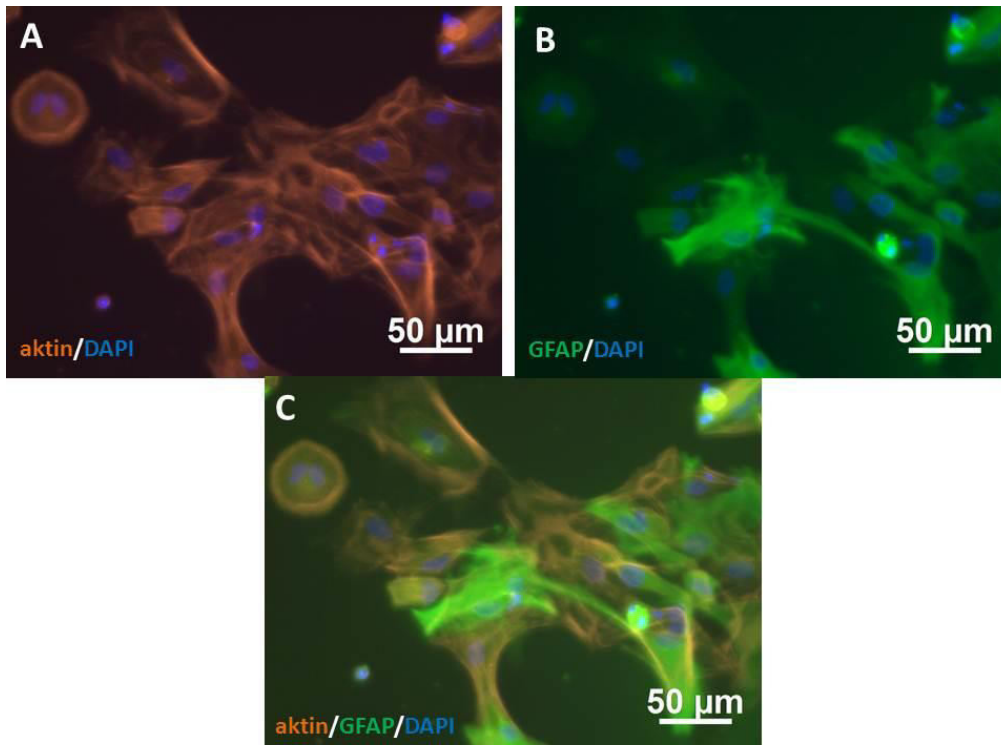
35. ábra Sima szilícium és nanostrukturált szilícium felületek határán elhelyezkedő sejt SEM felvétele. A sejt a két felület határának élén elnyúlt alakot vesz fel. A felszínen láthatóak a nem jól tapadó, illetve a haldokló sejtre jellemző morfológiai vonások (hosszú filopodium – fehér nyíl, bleb – piros nyíl).

**Megfigyeltem, hogy a primer asztroglia sejtek sejtváz-fehérjéinek elrendeződése, a sejtmag morfológiája, illetve sejtfelszíni morfológiai jegyek arra utalnak, hogy a sejtek a szilíciumfelületeken nem jól tapadnak, és gyakran apoptotikus jeleket mutatnak.**

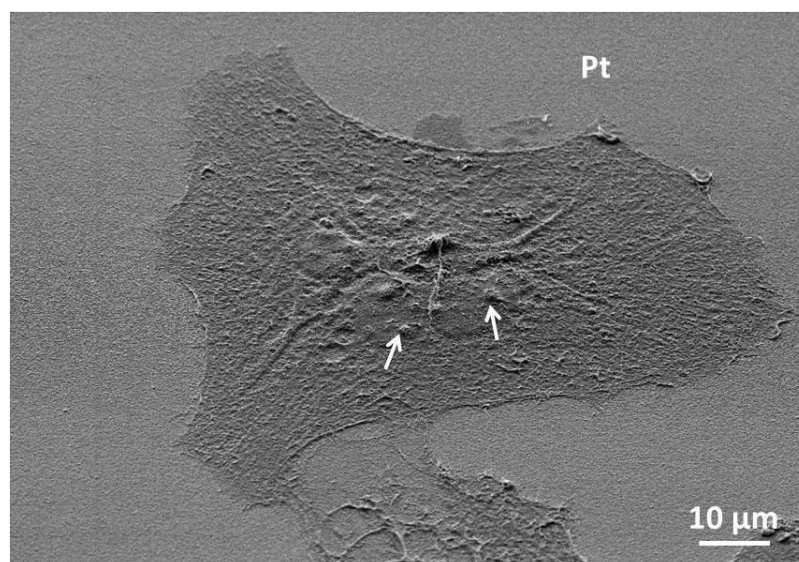
#### **Platina felületeken elhelyezkedő sejtek morfológiája**

A platina felületekre egyöntetűen igaz, hogy magasabb sejtszám figyelhető meg a felszínükön, mint a szilícium felületeken. A fluoreszcens felvételek tanúsága alapján a sejtek általában szétterültebbek, a GFAP és aktin filamentumok igen részletesen kivehetők (36. ábra). Az elektronmikroszkópos felvételek alapján hasonló megfigyelések tehetők. A képeken a kiterült sejteken felül az is látható, hogy a sejtmagok laposak, több esetben megfigyelhetőek a sejtmagvacskák is (37. ábra). A tapadási pontok megfigyelésénél láthatjuk, hogy a sejtek kevesebb és rövidebb filopodiumokkal rendelkeznek.





35. ábra Platina felületen tapadó primer asztrogliá tenyésztés fluoreszcens felvételei. A: aktin filamentumok (narancs) és sejtmagok (kék), B: GFAP filamentumok (zöld) és sejtmagok (kék), C: három csatornás felvétel. A sejtek egymással kapcsolatokat alkotnak, a sejtmagok általában kiterültebbek, mint a szilícium felületen elhelyezkedő sejtek esetében, a sejtek elnyúltabbak, jól kivehetőek a sejtvázfehérjék filamentumai.

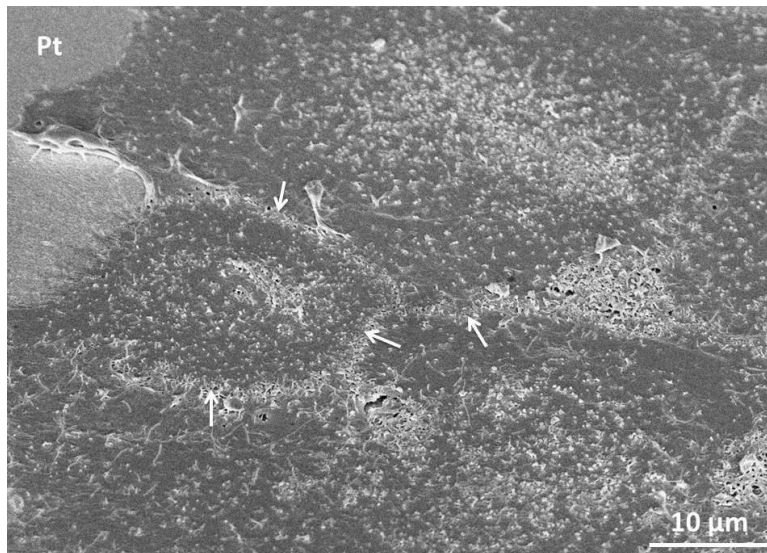


36. ábra Platina felületen fixált primer asztrogliá sejt SEM felvétele. A sejtplazma kiterjedt, a sejtmagok laposak, megfigyelhetőek bennük a nukleóluszok (fehér nyilak).

A platina felületen a szilícium felülethez képest a sejtek hálózatképzése is sokkal hangsúlyosabb. Ennek egyik oka bizonyára a jelentős sejtszámbeli különbség a két típusú felszín közt, hiszen a nagyobb sejtsűrűség miatt egymáshoz közelebb elhelyezkedő sejtek

könnyebben létesítenek egymással kapcsolatot, mely egy egészséges asztrocita tenyészet egyik ismérve. Szintén szerepet játszik ebben valószínűleg a platina felület egészséges tapadást támogató mivolta a szilícium felülettel szemben, mely a fenti, 36-37. ábrákon is látható.

A 38. ábrán jól látható a sejtek kapcsolata és határfelületeik.

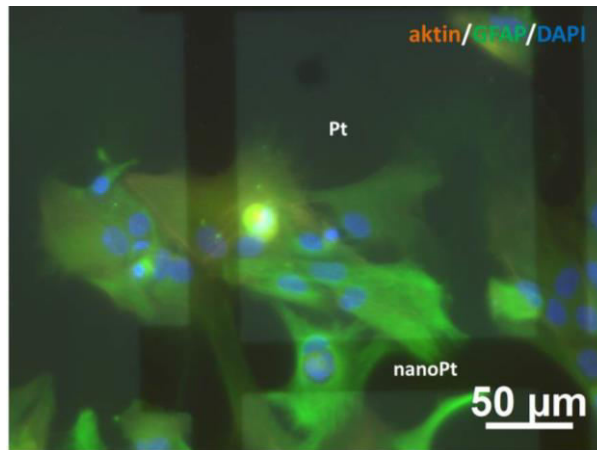


37. ábra Platina felületen megfigyelt egymáshoz kapcsolódó sejtek SEM felvétele. A sejtek laposak, elterültek, jól kivethetők a sejthatárok (fehér nyilak).

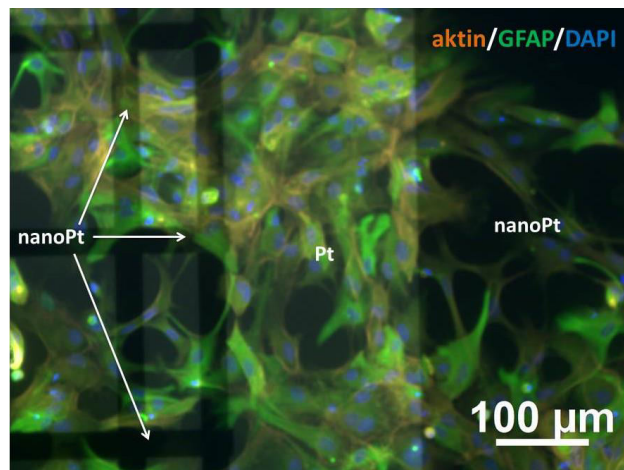
**Megfigyeltem, hogy a primer asztrocita sejtek sejtváz fehérjéinek elrendeződése, a sejtmag morfológiája, illetve sejtfelszíni morfológiai jegyek arra utalnak, hogy a platina felületeken a sejtek egészséges morfológiát mutatnak, és a felülethez való jó tapadás jelei figyelhetők meg rajtuk.**

#### **A topográfia hatásának vizsgálata**

Bár a fluoreszcens felvételek alapján a nanostruktúrák markáns hatása nem figyelhető meg sem a sejtszám, sem a sejtek morfológiájának tekintetében (39-40. ábrák), a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján a hatásuk nem elhanyagolható (41-44. ábrák).

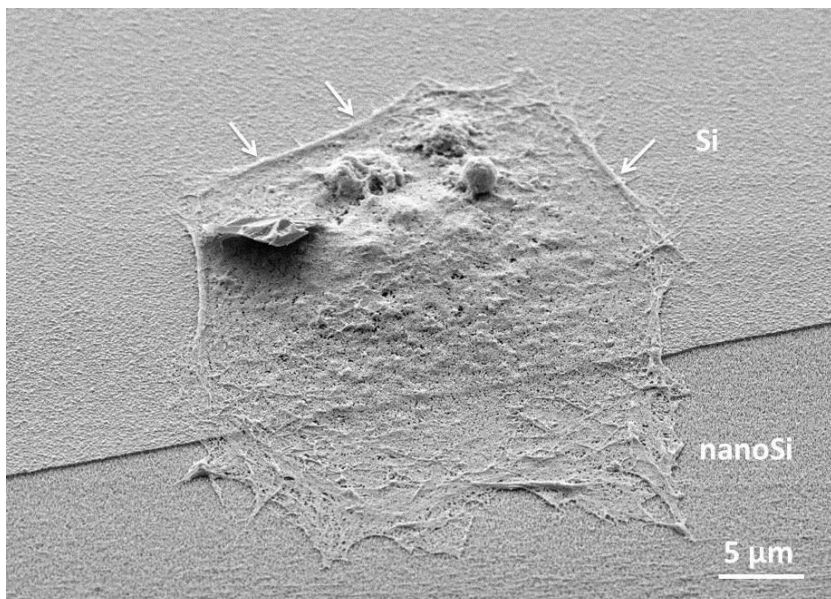


38. ábra Primer asztroglia sejtek háromcsatornás fluoreszcens felvétele nanostrukturált mintázott, platínával bevont felszínen (aktin – narancs, GFAP filamentumok - zöld, sejtmagok -kék). A sejtek mind a nanostrukturált, mind a sík felszínen a platina felületre jellemzően elterültek, jól kivethető filamentumokkal, sejtmagjaik szintén nagyok, elterültek, és előfordulnak mindkét morfológiájú felszínen.

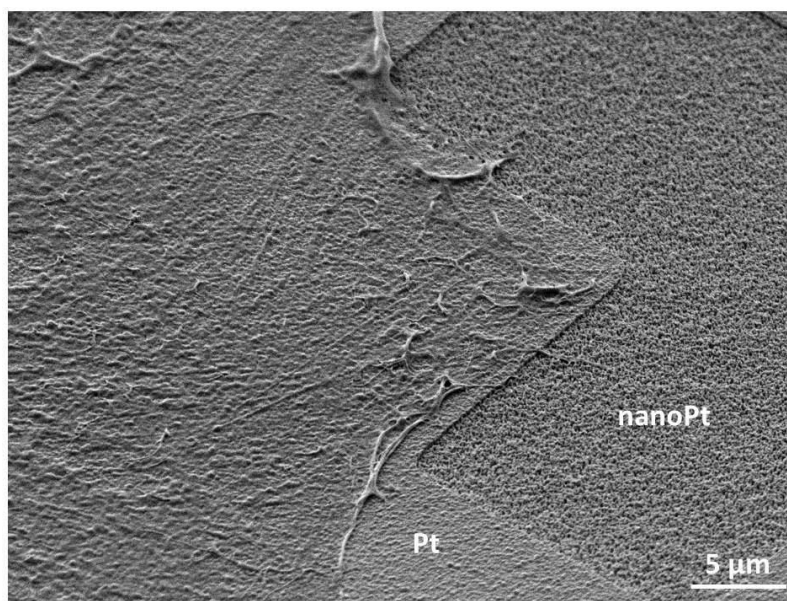


39. ábra Primer asztroglia sejtek mintázott Pt felszínen. Három csatornás felvétel: aktin filamentumok (narancs), GFAP filamentumok (zöld), sejtmagok (kék). A sejtek letapadásában, hálózatképzésében a különböző morfológiájú felszínek közt nem állapítható meg markáns különbség.

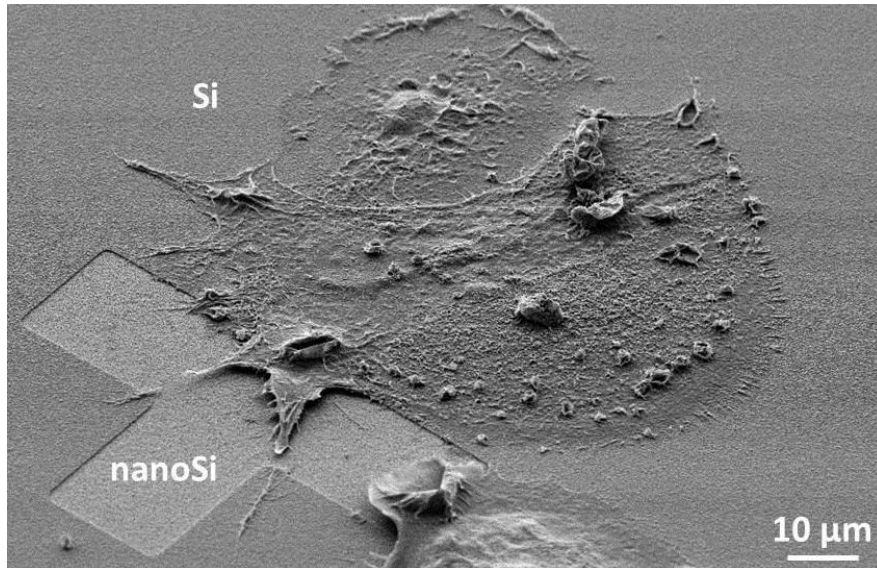
A SEM felvételek alapján mind a szilícium, mind a platina felszínek esetében látható, hogy a sejtek a sima és nanostrukturált felszínek határán, ha tehetik, elkerülik a nanostrukturált felületeket, azokra nem, vagy igen gyengén tapadnak. Egyes esetekben megfigyelhető a mozgó sejtekre jellemző úgynevezett „vezető él”, mely helyzete arra enged következtetni, hogy a sejt a fixálása időpontjában a nanostrukturált felszíntől távolodott.



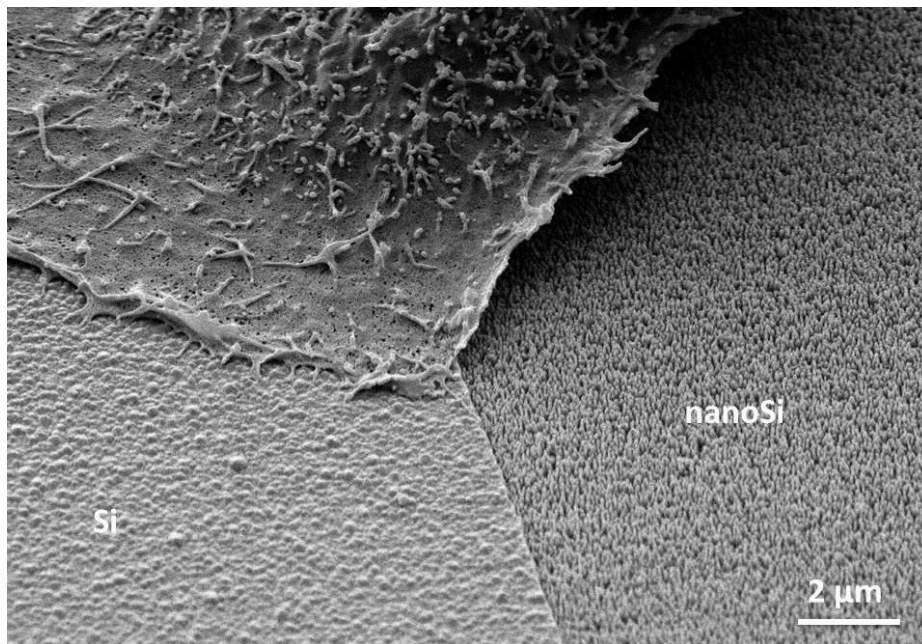
40. ábra Si-nanoSi határvonalon elhelyezkedő sejt SEM felvétele. A fehér nyilak a sejt feltételezett haladási élét, úgynevezett vezető élét mutatják, mely alapján a sejt a nanostrukturált felszíntől távolodik. Ez azonban biztonsággal time-lapse felvétellel volna megállapítható.



41. ábra Pt-nanoPt határon elhelyezkedő sejt SEM felvétele. A sejt mintha elkerülné a nanostrukturált felületet, míg a sík felszínre jól tapad.



42. ábra Si-nanoSi határon tapadó sejt SEM felvétele. A sejt jól láthatóan gyengébben tapad a nanostrukturált mintára, igyekszik azt elkerülni, felette átívelni. (A sejt sík felületre tapadó része is, a nem jól tapadó sejtre utaló felületi struktúrákat mutat, ahogy ez megfigyeléseink alapján a szilíciumra jellemző.)



43. ábra Primer asztroglia sejt membránjának egy részlete sík szilícium és nanostrukturált szilícium felület határán. Míg a sík felületre a sejt letapad, a nanostrukturált területtel nem létesít adhéziós pontokat.

Megállapítottam, hogy a sejtek felszínének elektronmikroszkópos vizsgálata alapján a primer asztroglia sejtek a sima felszíneket részesítik előnyben a nanostrukturálthoz képest, utóbbiakra gyengén tapadnak, azokat igyekeznek elkerülni.



A fluoreszcens és pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján tett megfigyelések alátámasztják a különféle felületeken mérhető sejtsűrűségek eredményeit. Jelentős, a kvantitatív mérések esetében szignifikáns a primer asztroglia sejtek platina felé irányuló preferenciája. A két anyag közt a 24 h és 48 h inkubációs idő után végzett mérések közt megfigyelhető sejtszám-növekedésbeli különbség a morfológiai megfigyelések alapján valós jelenség. A szilícium felületeken a platinához képest jelentősebb számban fordulnak elő a nem életképes sejtek felületi tulajdonságait mutató sejtek, melyek felszíne hólyagos, sejtmagjaik szétesnek. Ugyanakkor nem várt megfigyelés, hogy a felület morfológiája esetünkben nincs hatással a felületeken megfigyelhető sejtszámokra, és csak a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek utalnak arra, hogy a felületi strukturáltság nem közömbös a sejtek számára. Számos irodalmi adat támasztja alá, hogy az asztroglia sejtek különbséget tesznek a sík és nanostrukturált felületek közt, bár eredményeik ellentmondásosak. Turner és munkatársai méréseiben [107] a primer sejtek a nanostrukturált „szilícium-füvet” részesítették előnyben a nedves marással készült, mikron méretű felületi érdességgel bíró felületekkel szemben, mely a saját megfigyeléseinkkel szemben áll. Egyúttal azonban rávilágítottak a sejttenyészetek tulajdonságainak jelentőségére is, ugyanis megfigyeléseik alapján az immortalizált asztroglia sejtek (LRM55) éppen ellenkező módon viselkedtek.

Láthattuk, hogy a sejtek tapadási tulajdonságaiban és felület-preferenciájában *in vitro* körülmények közt jelentős különbségek mutatkoznak. A különféle mesterséges felületek fizikai és kémiai tulajdonságainak azonban vannak olyan vonatkozásai, melyek általánosan megfontolandóak a sejtekkel való interakció tekintetében. A sejtek a felületekre részben transzmembrán fehérjéken keresztül, részben a sejtek által szekretált extracelluláris mátrix fehérjéken keresztül tapadnak. Így az, hogy a felületek tulajdonságai befolyásolják az adszorbeálódó fehérjeréteg összetételét, jelenős befolyással lehet a sejtdhézis jelenségére [196], [197]. Olyan eredmények is születtek, melyek szerint a kollagén adszorpciójának mértékét nem befolyásolja a felületi struktúra, csupán a kémiai összetétel [198]. Azonban sík felületek és ZnO nanoszemcsék, nanooszlopok és nanolemezek karakterizálása során Wang és munkatársai úgy találták, hogy borjú szérum albumin számára a nanooszlopok jelentősen több fehérjekötő helyet biztosítanak [199]. Nguyen és munkatársai fekete szilícium nanostrukturákon és sík felületű szilícium mintákon hasonlították össze humán albumin és fibronectin adszorpcióját [200]. A fehérjék nagyobb mennyiségben adszorbeálódtak a nanostrukturált felszínekre, azonban egymástól eltérő viselkedést mutattak abban, hogy az oszlopok mely részeit preferálták, vagyis megmutatták, hogy a jelenség fehérjefüggő is.

Esetünkben a felületi kémia hatása világosan megmutatkozik mind az immortalizált, mind a primer sejttípusok esetében. A különféle sejtek más-más viselkedését az eltérő felületeken az irodalom számos helyen leírja. Míg az őssejtek esetében a nanostruktúrák hatása is kvantitatívan kimutatható volt, a primer asztroglia sejtek esetében csupán kvalitatív jellemzőkkel tudtuk leírni a jelenséget. Az asztroglia sejtek alapvető tulajdonságaiból és funkciójából azonban az következik, hogy működésüket a lokális szöveti környezet igen erősen befolyásolja, szelektív asztroglia tenyészetben viselkedésük ezért több szempontból is markánsan különbözhet az *in vitro* körülmények közt megfigyelhetőtől. A nanostruktúráknak e sejttípusra, és annak reaktivitására gyakorolt hatásának vizsgálatához *in vivo* mérésekre is szükség van.

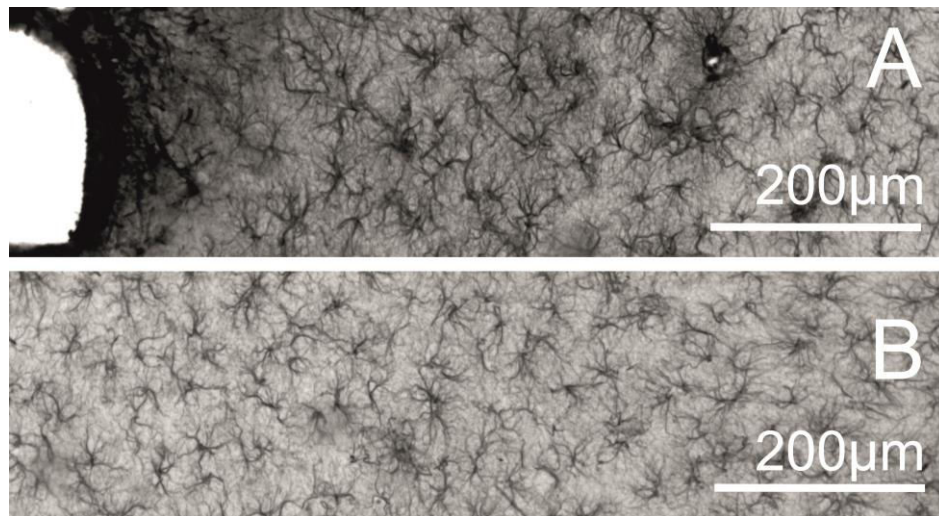
#### 4.4. *In vivo* vizsgálatok

A következő fejezetekben az általunk vizsgált nanostrukturált szilícium tesztfelület patkány agykérgébe, 8 hetes krónikus beültetés után végzett vizsgálatainak eredményeit ismertetem. A nanostrukturált szilícium felületet sík, illetve mikron méretű szemcsés szilícium felülettel, valamint mikrométerű mintákkal rendelkező, fluorokarbon-polimerrel bevont felülettel hasonlítottuk össze. Vizsgáltuk a kialakuló gliózis súlyosságát a szövet GFAP festésével, valamint az implantátum különféle felületei közelében túlélő sejtek számát a szövet NeuN festésével, az implantátumtól mért különböző távolságokban. Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A különféle implantátum-felületek befolyásolják-e a gliareakció súlyosságát?
- A különféle implantátum-felületek befolyásolják-e az implantátum közelében túlélő idegsejtek számát?

##### 4.4.1. Gliózis súlyossága a különféle felületek környezetében

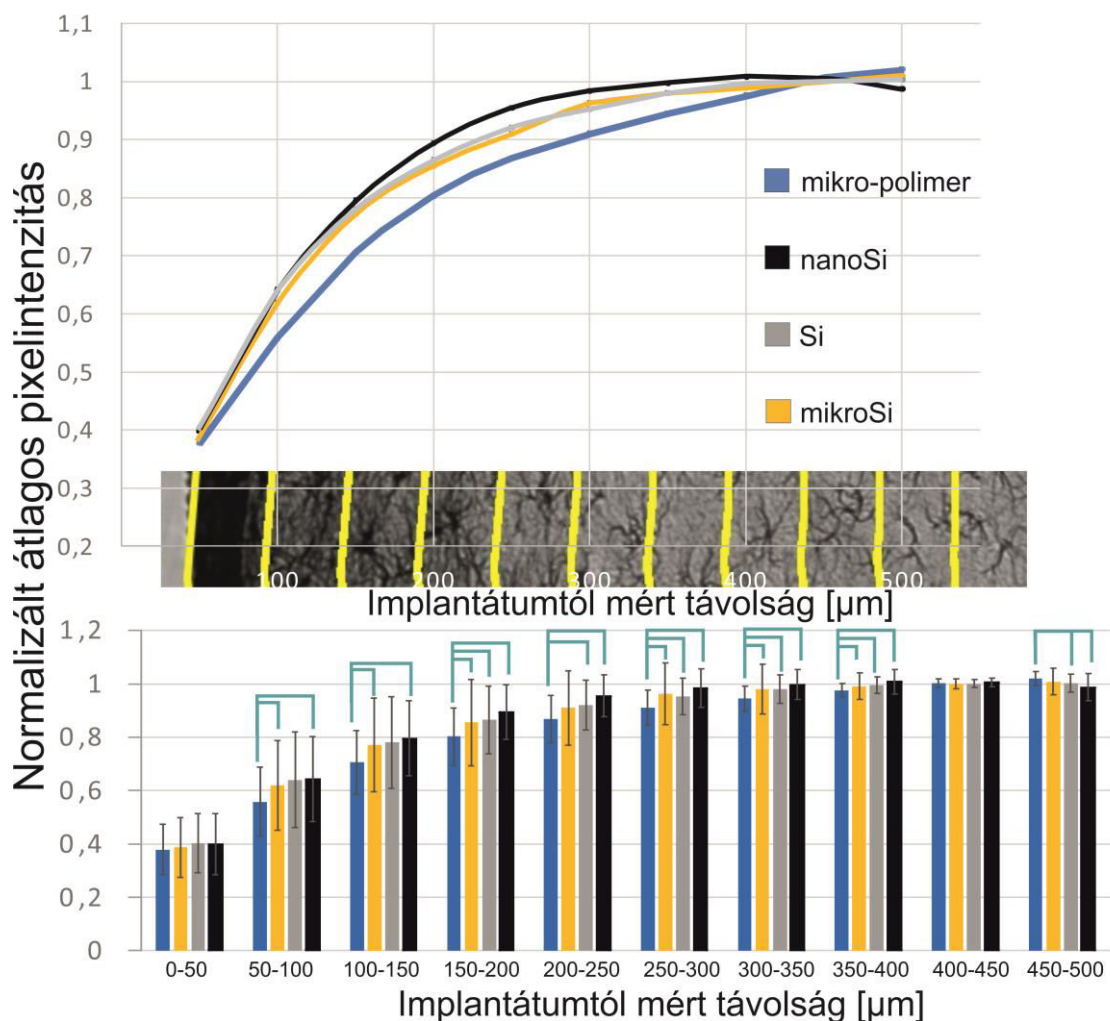
A reaktív gliózis vizualizálására általánosan felhasznált módszer a GFAP festés. A 45. ábrán az implantátum közvetlen közelében és a távolabb, 1 mm-re, intakt távolságnak feltételezett szövetben megfigyelhető asztroglia festés látható.



44. ábra GFAP markerrel festett idegszövet metszet fénymikroszkópos felvétele az implantáció helyéhez közel (A) és intaktnak tekintett távolságban (B, kb. 1 mm). Megfigyelhető az implantáció közvetlen közelében az igen erős GFAP festődés, és a sérülés helyétől való távolodással annak csökkenő intenzitása.

Az egyes felvételeken mért átlagos pixelintenzitást az implantátumtól való távolság függvényében a 46. ábra mutatja. Különböző színnel a különböző felületeket ábrázoltuk. Az értékeket az átlagos háttér-pixelintenzitáshoz (400-500 µm) normáltuk.





45. ábra A gliózis súlyosságának kvantitatív elemzése a GFAP festődés intenzitásának változása alapján az implantáció helyétől való távolság függvényében. Az első 50  $\mu\text{m}$  távolságban az egyes felületek közt nincs szignifikáns különbség, ezt a régiót egyöntetűen erőteljes gliózis jellemzi. Az 50-400  $\mu\text{m}$  távolságokban szignifikáns különbség látható a mikro-polimer és a mikroSi, valamint nanoSi felszínek közt ( $p < 0,05$ ).

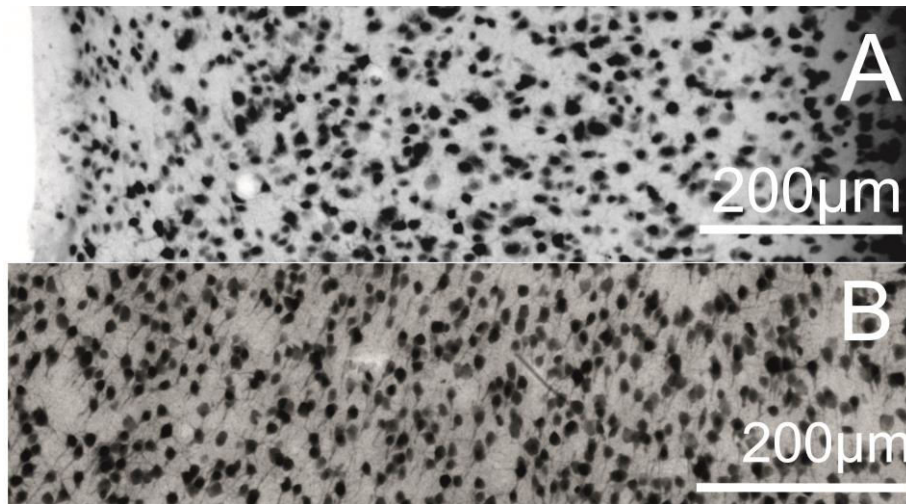
Az implantálás helyétől való távolság növekedésével a festés intenzitása csökkent minden típusú felület esetében. Az implantátum közvetlen közelében, 50  $\mu\text{m}$ -ig minden felület esetében erőteljes gliózis figyelhető meg, függetlenül a felület anyagi minőségétől vagy topográfiájától. 50-300  $\mu\text{m}$  távolságokban a nanoSi felület környezetében, 4-5%-kal alacsonyabb volt a GFAP festődés mértéke, mint a többi felület esetében, a különbség azonban nem volt szignifikáns. Szignifikáns különbség ( $p < 0,05$ ) volt megfigyelhető a mikro-polimer és a nanoSi felületek körül 50-500  $\mu\text{m}$  távolságokban. Szintén szignifikáns volt a különbség 150  $\mu\text{m}$  és 500  $\mu\text{m}$  közt a mikro-polimer és a Si, illetve a mikroSi oldalfalak közt. Ezeket a különbségeket azonban valószínű, hogy a felületek kémiaja, mintsem a topográfiája okozta, tekintve, hogy minden szilícium-polimer felületpár közt jelentkeztek a különbségek, míg a különféle topográfiájú szilícium felületek közt nem figyelhető meg hasonló.

Megmutattam, hogy a GFAP festődés mértéke Wistar patkány agyában, 8 hét implantációs időt követően az implantátum közvetlen közelében ( $50\ \mu\text{m}$ ) független a felület topográfiájától és kémiaiától a négy vizsgált területet tekintve.

Megállapítottam, hogy az implantálás helyétől  $50\ \mu\text{m}$  -  $400\ \mu\text{m}$  távolságokban a GFAP festődés erősebb a mikro-polimer felület közelében, mint a mikroSi, valamint a nanoSi felületek környezetében  $p=0,05$  szignifikancia szinten.

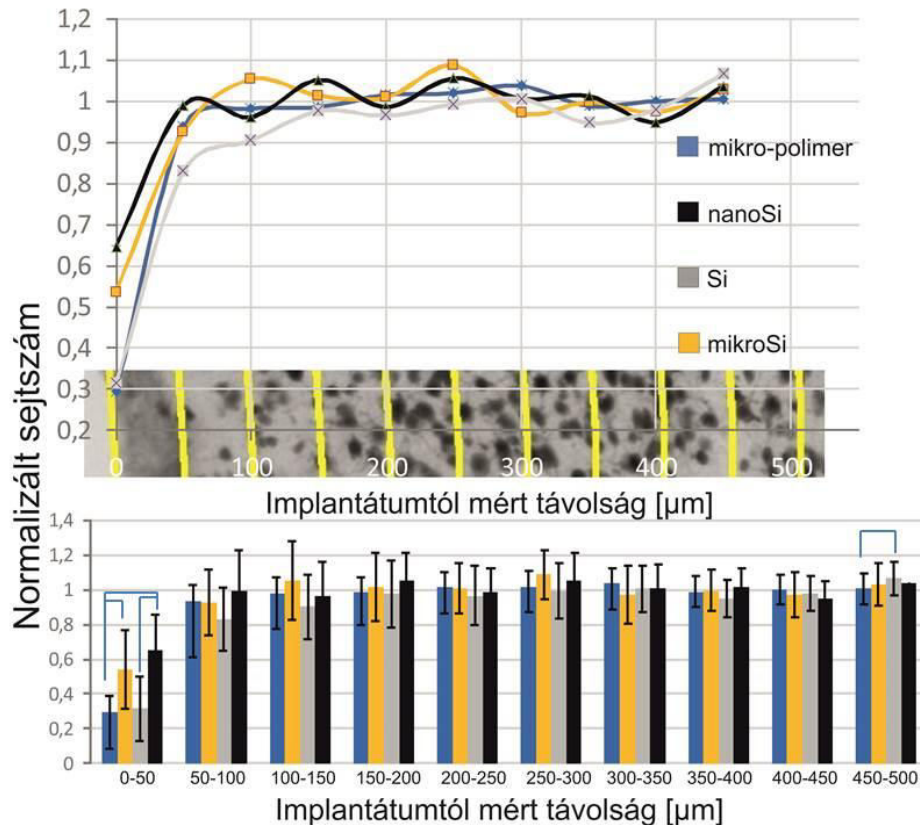
#### 4.4.2. Idegsejtek túlélése az implantátum környezetében

Az implantátum környezetében túlélő idegsejtek számának meghatározására a szeletek NeuN festését alkalmaztuk. A 47. ábra az implantátum közelében, illetve tőle 1 mm távolságra eső területen mutat egy reprezentatív festést.



46. ábra NeuN markerrel festett idegszövet metszet fénymikroszkópos felvétele az implantáció helyéhez közel (A) és intaktnak tekintett távolságban (B, kb. 1 mm). Az implantáció helyének közvetlen közelében látható a nagyjából  $50\ \mu\text{m}$  széles, sejtekben igen ritka terület. A szöveti sérülés következtében a neuronok jelentős része itt elpusztul. Más részük feltehetően a glia heg kialakulását kísérő másodlagos neuronpusztulás áldozatává lesz. A sérülés helyétől való nagyobb távolságban azonban a sejtszámok igen gyors normalizálódása látható, és már  $50\text{-}100\ \mu\text{m}$  után a referenciával egyezőnek tűnik a szövet.

Jelentős sejtszám csökkenés volt megfigyelhető az implantátumtól mért  $50\text{-}100\ \mu\text{m}$ -es távolságban. Az eredmények a szűrt csatornától való távolság függvényében a 48. ábrán láthatóak, különböző színnel ábrázolva a különféle felületeket. Referenciának tekintett távolság ( $400\text{-}500\ \mu\text{m}$ ) sejtszámához normáltuk az eredményeket.



47. ábra Az implantátum közelében túlélő idegsejtek számának kvantitatív elemzése a neuronok NeuN festésével meghatározott sejtszámok változása alapján az implantáció helyétől való távolság függvényében. A sérüléstől mért első 50  $\mu\text{m}$  távolságban a sejtpusztulás mértéke igen jelentős, azonban szignifikáns különbség mutatkozik az egyes felületek közt. A mikro-polimer felület közelében szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) kevesebb túlélő sejt figyelhető meg mind a mikroSi, mind a nanoSi felületekhez képest. Szignifikáns különbség mutatkozott továbbá a Si és nanoSi felületek közt túlélő sejtek számában, és utóbbiak közelében található több túlélő idegsejt. A megfigyelések a felületek kémiai tulajdonságainak nyilvánvaló befolyása mellett a felületek morfológiájának jelentőségére is utalnak.

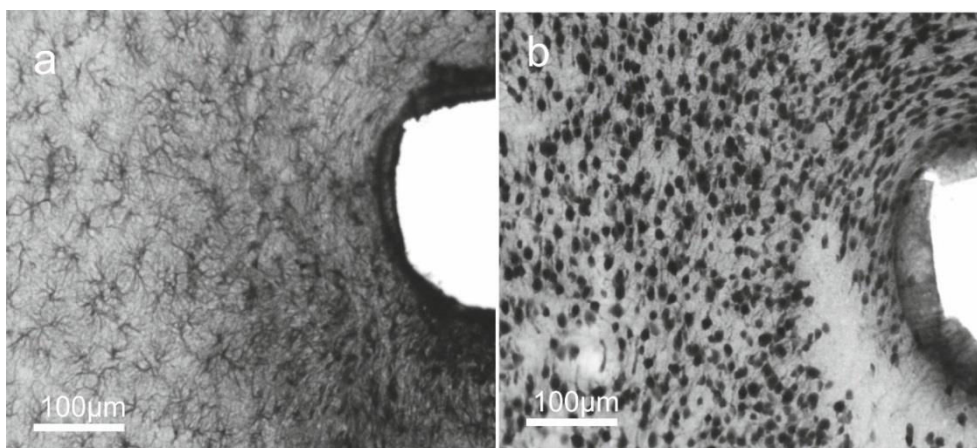
A kezdeti jelentős sejtvesztés után a távolsággal rohamosan növekvő sejtszám figyelhető meg, és 50  $\mu\text{m}$  -nél nagyobb távolságban gyakorlatilag nem figyelhető meg jelentős különbség sem a különböző felületek közt, sem a referencia távolsághoz képest.

Az implantátumtól mért 50  $\mu\text{m}$  azonban nagyon fontos terület a regisztrálható jelek szempontjából, mivel az egysejt aktivitás ebből a távolságból vezethető el [118], [201]. Ebben a távolságban jelentős különbségeket találtunk a vizsgált felületek közt.

A legjelentősebb sejtvesztés a mikro-polimer bevonatú felület környezetében figyelhető meg, a legtöbb élő idegsejtet pedig a nanoSi felület közelében sikerült megfesteni. Szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbség figyelhető meg mind a nanoSi, és mikro-polimer, mind a mikroSi és mikro-polimer felületek közt, valamint a Si és nanoSi felületek közt, mely jelzi mind a felületek kémiájának, mint a topográfiájának jelentőségét.

**Megmutattam, hogy az implantálás helyétől mért 50  $\mu\text{m}$  távolságban  $p=0,05$  szignifikancia szinten különbségek figyelhetők meg a felületek közelében túlélő, NeuN festéssel vizualizálódó neuronok számát tekintve. Szignifikáns különbség adódott a mikro-polimer felület és a mikroSi, valamint nanoSi felületek közt, és a Si és nanoSi felületek közt, és az utóbbiak közelében található több túlélő sejt.**

A gliareakció erőssége és a sejtszám csökkenés közti korreláció az első 50  $\mu\text{m}$ -n számolt kvantitatív eredmények alapján és a mikroszkópos képek kvalitatív vizsgálata alapján is jól megfigyelhető (49. ábra). Ahogy a gliózis lefolyásának megismerésekor is láthattuk, erős GFAP pozitivitás kíséri egyrészt magát az implantációt, mely a szövet sérülése miatt egyértelműen idegsejtek pusztulásával jár. Másrészt a gliareakció hetek alatt történő kifejlődésével és a hegyszövet tartóssá válásával egy másodlagos neuronpusztulási folyamat is bekövetkezik.



**48. ábra** Két egymást követő (egymástól 60  $\mu\text{m}$  távolságban levő) szöveti metszet GFAP (a) és NeuN (b) festése az implantáció helyének közelében. Jól látható a sérülés alsó ívének mentén a súlyos gliózisra utaló GFAP jel és a jelentős neuronpusztulás párhuzama.

Ahhoz azonban, hogy megállapítsuk, hogy az általunk megfigyelt korrelációban melyik folyamat milyen hangsúlyosan játszik szerepet, további kísérletekre volna szükség, vizsgálva nemcsak az implantáció utáni 8. hét állapotát, hanem a védekező reakció lefolyásának korábbi fázisait is.

Megfigyeléseink egybehangzanak az irodalomban leírtakkal is. Moxon és munkatársai porózus és sima Si felületeket vizsgáltak hisztológiai módszerekkel, NeuN, GFAP és ED-1 (makrofág) festésekkel [118]. Nem találtak szignifikáns különbséget az implantátumok közelében a gliareakcióban, bár nem szignifikáns különbségek megfigyelhetők voltak.

Jelentős különbségek voltak azonban a túlélő neuronok számában a pórusos Si felület javára. Fontos azonban megjegyezni, hogy munkájuk során 1 hét implantáció után vizsgálták a szöveteket, mely időtartam alatt a gliareakcióban a hegeképződés folyamata még nem jut jelentős szerephez az agyszövet védekező reakciójában.

Azemi és munkatársai 1, 4 és 8 hetes implantációs időtartamok után vizsgálták a szövetet, szintén GFAP és NeuN festésekkel [127]. Ebben a vizsgálatban az implantátumfelületek L1 adhéziós fehérjével történő bevonásának hatását vizsgálták a biokompatibilitásra nézve. Jelentős különbséget találtak a fehérjével bevont és a referencia felületek közt mind a felületek közelében túlélő neuronok számát, mind a gliareakció súlyosságát tekintve, ezek alapján bevonattal ellátott felületek igen ígéretesnek tűntek.

Eredményeinket és az irodalom eredményeit összevetve feltehető, hogy a gliareakció akadályozásához, lefolyása súlyosságának befolyásolásához a felületek topográfiájának módosítása önmagában nem elegendő.

#### 4.5. *In vitro* és *in vivo* biológiai mérések eredményének összefoglalása

NE-4C neuroektodermális őssejtek			BV2 sejtek	Primer asztroglia sejtek			Patkány élő agyszövet	
Életképesség vizsgálata: MTT, DAPI fotometria	Fluoreszcens mikroszkópiás sejtmorfológia vizsgálat	<i>In vitro</i> differenciálódás	Életképesség vizsgálata: DAPI fotometria	Sejtszámok meghatározása	Fluoreszcens mikroszkópiás sejtmorfológia vizsgálat	Pásztázó elektronmikroszkópos sejtmorfológia vizsgálat	GFAP festés erőssége az implantátumtól való távolság függvényében	Túlélő sejtszám (NeuN festés) az implantátumtól való távolság függvényében
<ul style="list-style-type: none"> <li>• A Si felületeken magasabb sejtszám, mint a Pt felületeken</li> <li>• Sejtszám csökkenés 24h alatt</li> <li>• Legkisebb mértékű csökkenés a nanoSi felületen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si felületeken egyedi, kiterült sejtek</li> <li>• Pt felületeken aggregátumok és kevésbé kiterült sejtek utalnak a rosszabb tapadásra</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A sejtek mind a 4 vizsgált felületen képesek neuronná differenciálódni</li> <li>• A kialakuló „szövetkezdemény” a platina felületekről és a nanostrukturált felületekről leválik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A Pt felületeken több sejt tapad ki, mint a Si felületeken.</li> <li>• Az NE4C mérésekkel szemben nem figyelhető meg 24 h alatt sejtszám csökkenés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A Pt felületen magasabb kitapadó sejtszám, mint a Si felületen.</li> <li>• A nanostrukturált -ság alapján nem mutatkozik különbség</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A Pt-n található sejtek jól tapadó, egészséges sejtek morfológiáját mutatják</li> <li>• A Si felületen található sejtek gyakran apoptotikus jegyeket mutatnak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A sejtek mind a Si mind a Pt esetében igyekeznek elkerülni a nanostrukturált felületeket. Ez a jelenség a kvantitatív mérésekben nem mutatkozott meg.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0-50 µm távolságban egységesen erős GFAP festődés</li> <li>• 50-400 µm közt erősebb GFAP festődés a mikro-polimer felület közelében; nincs különbség a Si felületek közt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0-50 µm távolságban az implantátumtól több túlélő sejt a nanoSi közelében, mint a Si közelében</li> <li>• több túlélő sejt a mikroSi, mint a mikro-polimer közelében</li> </ul>

10. táblázat *In vitro* és *in vivo* biológiai mérések eredményeinek összefoglalása

## 5. Tézisek

### I. **Plazmamarási technikával vékonyréteg polikristályos szilíciumból szabályozott módon alakítottam ki nanostrukturált felületet, és az alkalmazott eljárás integrálható agyi elektródok gyártási sorába. [I]**

**I.a.** Megállapítottam, hogy a fekete szilícium nanostrukturák átlagos oszlopmagassága és oszlopsűrűsége a marás paramétereinek változtatásával az alábbiak szerint hangolható. Az egykristályos szilícium minták esetében a vizsgált marási paraméterek (*hőmérséklet: -90 °C, -100 °C, -110 °C, O<sub>2</sub> térfogatáram: 10 sccm, 15 sccm, RF teljesítmény: 2 W, 3 W, marási idő: 1 perc*) mellett az oszlopmagasság 690 nm±76 nm és 1973 nm±131 nm közé, az oszlopsűrűség pedig 7,6±2,5 és 22,5±5,9 db/μm<sup>2</sup> közé esik.

A polikristályos szilícium minták esetében 1 μm vastag rétegből kiindulva az oszlopmagasság 355 nm±6 nm és 783 nm±116 nm közé esik, az oszlopsűrűség pedig 9,4±2,2 db/μm<sup>2</sup> és 71,7±14 db/μm<sup>2</sup> közt változik. A kiindulási polikristályos Si réteg leválasztási hőmérsékletétől jelentősen függ az O<sub>2</sub> térfogatáram változásának hatása a kialakuló nanostrukturák morfológiájára. A leválasztási hőmérséklet 610 °C -ról 630 °C -ra történő változásával a csökkenő O<sub>2</sub> térfogatáram mindkét esetben oszlopsűrűség csökkenést és magasság növekedést eredményez, azonban a 630 °C-n leválasztott minta esetében mindkét változás jelentősen kisebb mértékű, vagyis ez a kiindulási felület kevésbé érzékeny a paraméter változtatására.

**I.b.** Megmutattam, hogy a fekete szilícium nanostrukturák kialakítása az agyba implantálható multielektrodok gyártási sorába illeszthető, és fém réteggel bevonva (*15 nm Ti, 100 nm Pt*) kontaktusfelületként funkcionálhat. Továbbá a nanostrukturák marási paramétereitől függően akár 44x-es fajlagos felületnövekedés is elérhető ezzel a módszerrel, mely által az elektródok impedanciája csökkenthető.

### II. **Megmutattam, hogy a fekete-szilícium, és platinával bevont fekete-szilícium felületek befolyásolják az idegi eredetű sejtek tapadását és életképességét, és a felületek anyagi minősége és morfológiája más-más hatást vált ki különféle sejt típusok esetében. [II]**

**II.a.** Beláttam, hogy a vizsgált felületek (*bioaktív bevonat nélküli polikristályos szilícium sík felszín és nanostrukturák: 70-110 darab oszlop/μm<sup>2</sup>, átlagosan 600 nm magasság, random elhelyezkedés a felületen; és ugyanilyen felületi tulajdonságú, 15 nm Ti/30 nm Pt*

*bevont felületek*) sem az NE-4C, sem a BV2 sejt típusra nem gyakorolnak közvetlen toxikus hatást.

**II.b.** Megállapítottam, hogy 4 órás életképesség vizsgálat során, az NE-4C sejt vonal sejtjei nagyobb számban tapadnak le és maradnak életben a nanostrukturált szilícium és síkfelületű szilícium felületeken  $p=0,05$  szignifikancia szinten a platinával bevont felületekkel szemben. A felületeken található sejtek száma 24 óra inkubálás után végzett mosás alatt jelentősen lecsökken, ami a sejtek igen gyenge tapadására utal. A legkisebb mértékű sejtszám csökkenés a vizsgált felületek közül a nanostrukturált szilícium felületen figyelhető meg.

**II.c.** Megállapítottam, hogy az immortalizált mikroglia (BV2) sejtek a négy vizsgált felületet tekintve a síkfelületű platinán a többi felülethez viszonyítva nagyobb számban tapadnak le.

**II.d.** Megállapítottam, hogy az NE-4C sejtek mind a négyféle felületen képesek retinsavas indukció mellett neuronná differenciálódni.

**III. Megmutattam, hogy a primer egér asztroglia sejtek statisztikailag kimutatható különbséget tesznek a tenyésztő felületek közt annak felületi anyaga alapján, de a strukturáltsága alapján nem. [III]**

**III.a.** Megállapítottam, hogy a primer asztroglia sejtek a szilíciumfelülethez viszonyítva nagyobb számban tapadnak le és élnek túl a platinafelületeken, a felületi topográfiától függetlenül  $p=0,05$  szignifikancia szinten. Megfigyeltem, hogy a primer asztroglia sejtek sejt váz-fehérjéinek elrendeződése, a sejtmag morfológiája, illetve sejt felszíni morfológiai jegyek arra utalnak, hogy a sejtek a szilíciumfelületeken nem jól tapadnak, és gyakran apoptotikus jeleket mutatnak. Ezzel szemben, azonos paramétereket vizsgálva a platinafelületeken a sejtek egészséges morfológiát mutatnak, és a felülethez való jó tapadás jelei figyelhetőek meg rajtuk.

**III.b.** Megállapítottam, hogy a sejtek felszínének elektronmikroszkópos vizsgálata alapján a primer asztroglia sejtek a sima felszíneket (*100-200 nm szemcseméretű polikristályos Si alapréteg*) részesítik előnyben a nanostrukturálthoz (*70-110 darab oszlop/ $\mu\text{m}^2$ , átlagosan 600 nm magasság, random elhelyezkedés a felületen*) képest, utóbbiakra gyengén tapadnak, azokat igyekeznek elkerülni.



**IV. Beláttam, hogy patkány agyába ültetett különféle kémiai és morfológiájú oldalfalakkal rendelkező eszköz különböző felületű oldalfalai mellett a GFAP festődés erőssége, és az életképes idegsejtek száma  $p=0,05$  szignifikancia szinten különböző. [IV]**

**IV.a.** Megmutattam, hogy a GFAP festődés mértéke Wistar patkány agyában, 8 hét implantációs időt követően, az implantátum közvetlen közelében ( $50 \mu\text{m}$ ) független a felület topográfiájától és kémiai jellegétől a négy vizsgált felületet (*nanostrukturált polikristályos szilícium: 70-110 darab oszlop/ $\mu\text{m}^2$ , átlagosan 600 nm magasság, random elhelyezkedés; - nanoSi; mikrostrukturált, fluorokarbon polimerrel bevont felület- mikro-polimer; polikristályos szilícium, 100-200 nm szemcsemérettel -Si; és nem polírozott szilícium felület- mikroSi*) tekintve. Megállapítottam, hogy az implantálás helyétől  $50 \mu\text{m}$  -  $400 \mu\text{m}$  távolságokban a GFAP festődés erősebb a mikro-polimer felület közelében, mint a mikroSi, valamint a nanoSi felületek környezetében. Ugyanakkor az implantálás helyétől mért  $50 \mu\text{m}$  távolságban  $p=0,05$  szignifikancia szinten különbségek figyelhetők meg a felületek közelében túlélő, NeuN festéssel vizualizálódó neuronok számát tekintve. Szignifikáns különbség adódott a mikro-polimer felület és a mikroSi, valamint nanoSi felületek közt, és a Si és nanoSi felületek közt, és az utóbbiak közelében található több túlélő sejt.

## 6. Összefoglalás és hasznosíthatóság

A bionika egyik fontos feladata az élő szövetekkel, sejtekkel történő hatékony interakció diagnosztikai és terápiás célokból. A szövetek, sejtek működésének minél pontosabb, akár molekuláris szintű megismerése a segítségünkre lehet olyan eszközök tervezésénél és készítésénél, melyek ezeket a célokat szolgálják. Az idegszövet, és a központi idegrendszer működésének vizsgálata és az abba történő terápiás célú beavatkozás számos olyan helyzetben felhasználható, ahol a konzervatív medicina és a gyógyszeres terápiák már nem hatékonyak, elérve ezzel a páciensek életminőségének javítását.

Az agy működésének makroszinten történő vizsgálatára akár non invazív megoldás, az EEG is a rendelkezésünkre áll, azonban ahogy a funkciók egyre aprólékosabb megismerésére törekszünk, szükségessé válik, hogy a mérő és ingerlő berendezéseket az idegsejtek közelében helyezhessük el. Az élő szövetbe helyezett idegen test jelenlétére a szervezet természetes védekező reakcióval válaszol, melynek jelentős része az úgynevezett reaktív gliózis. A folyamat az idegtudósok számára is számos kérdést vet fel a szövetek védelmét, és a mechanizmus hosszú távú, potenciálisan hátrányos hatásait illetően, mivel ennek következtében a mechanikai sérülés miatt elpusztult idegsejteken túl további szövetrészek is sérülhetnek (másodlagos neuronpusztulás). Azonban egy evolúciósan erősen konzervált mechanizmus esetében feltételeznünk kell, hogy a folyamat a szövet hosszú távú épségére nézve összességében protektív hatással van. Az implantátum funkciókészségét tekintve azonban egyértelműen hátrányos a jelenség. A sérülés környezetében elhaló idegsejtek miatt a mérhető jelekkel rendelkező sejtek a kontaktusoktól távolabb kerülnek, csökkentve ezzel az egysejt aktivitás mérésének esélyét. A kialakuló hegszövet szigetelő funkcióval bír, így a jel/zaj viszony tovább romlik. A sérült szövet regenerációja során az elveszett idegsejtek, a térfoglaló hegszövet és az axonnövekedés számára kedvezőtlen kémiai környezet miatt valószínűleg hosszú távon sem képes a fiziológiához közeli állapot helyreállni. Így a beültetett eszköz hatékony működését az idegszövet védekező reakciója hosszú távon jelentősen rontja.

A sejtek működését mind fiziológiás, mind patológiás körülmények közt befolyásolják az őket körülvevő környezet kémiai és fizikai paraméterei, köztük a szövet 3D topográfiája is. A sejtek lokális környezete az extracelluláris mátrix, és a szomszédos sejtek felületi struktúrái a néhány 10-100 nanométeres mérettartományba esnek. A topográfia sejtfunkciókat befolyásoló hatása potenciális eszköz lehet az implantátumot tervezők kezében, mert megfelelő topográfiával rendelkező felület biztosításával lehetőség nyílhat az élő szövet működésének részleges irányítására. Az implantációt kísérő szövetsérülés esetén a sejtek működésének a fiziológiás körülmények felé történő irányítása, természetesen a szöveti védekező reakció pozitív hatásainak szem előtt tartásával, lehetőséget biztosíthat az agyi implantátumok

hatékony krónikus működésének időbeli kiterjesztésére. A környezet kémiájának és topográfiájának sejtműködésre gyakorolt hatásainak kérdése igen összetett, sejtípusonként változó, és a kísérletekhez választott modell számos tulajdonsága is befolyásolja a jelenségek vizsgálhatóságát.

A gliózisban résztvevő fő sejtípusok, az asztroglia és mikroglia sejtek, valamint neuronok *in vitro* és *in vivo* körülmények közt történő vizsgálata a különféle kémiai és nanotopográfiai jellemzőkkel bíró felületek környezetében közelebb juttathat bennünket e sejtípusok működésének megismeréséhez. Ezáltal lehetőségünk nyílna olyan finoman hangolt mesterséges nanostrukturált felületek előállítására, melyek segítségével krónikus körülmények közt, a szövet minél kisebb mértékű megsértése mellett végezhetőek az agy működésének vizsgálatára vagy terápiájára irányuló beavatkozások.

A mikrotechnológia eszköztára lehetővé teszi nagy pontosságú, pontosan reprodukálható eszközök elkészítését, melyek általunk használt alapanyaga, a szilícium nem toxikus. Az eszközökön a mérési körülmények által támasztott igények szerint akár igen kis méretű, ezáltal nagy térbeli jelregisztráló felbontást biztosító kontaktusok, és a hozzájuk tartozó vezetékvezés, és akár más funkcionális eszközök is elhelyezhetőek. A technológiai sorba egyszerűen integrálható, szelet szinten, így egyszerre sok eszközön elkészíthető úgynevezett fekete-szilícium módszerrel néhány száz nanométer tartományba eső, hangolható oszlopsűrűségű és magasságú nanostrukturák készíthetőek, és azokat platina réteggel bevonva elektromos kontaktálási felületként is funkcionálhatnak.

Vizsgálataink eredményei alapján az idegi őssejtek képesek az így nanostrukturált implantátumfelületeken neuronná differenciálódni, és az így kialakult idegsejtek hálózatokat képezni. Azonban a platina felületekről a létrejött „szövetkezdemény” leválik, feltehetően azért, mert a sejtek közti adhézió erősebb a sejtek és a felület közti kapcsolatnál, ami a hegyszövet egy jellemzője is. A BV2 immortalizált mikroglia sejtek és a primer asztroglia sejtek platina felület felé mutatott preferenciája is arra enged következtetni, hogy a hosszú távú biokompatibilitás szempontjából a platina, mint implantátumfelület nem optimális választás. Azt is láthattuk azonban, hogy megfigyelhető, hogy a gliózisban résztvevő asztroglia sejtek platina-preferenciáját a felület nanostrukturálása némileg csökkenti. Az *in vivo* mérések során megállapítottuk, hogy a nanostrukturált szilícium felülettől jelregisztrálás szempontjából releváns távolságban több idegsejt él túl, mint a sík referencia Si felület mellett.

A fenti eredmények felhasználhatóak lehetnek *in vitro* tesztchipek tervezésére. Az alkalmazott technológia lehetővé teszi mikrostrukturált mintázatokban nanostrukturált, illetve platinával bevont felszínek létrehozását. Az idegsejtek nyúlványnövekedésének irányítására létrehozhatóak olyan felületek, melyeken az asztroglia sejtek irányítottan, vagy szelektíven

tapadnak. Az ilyen asztroglia aljzaton tenyésztett idegsejtek irodalmi adatok alapján szintén képesek lehetnek irányítottan növekedni [125]. Szintén alkalmas lehet ilyen mesterséges felszín tiszta idegsejt tenyészetekben irányított sejt vagy nyúlványnövekedés elérésére, ennek karakterizálására azonban még számos további, idegsejtekkel végzett *in vitro* mérés szükséges. Az ilyen eszközökkel lehetőség nyílik az idegsejtek növekedésével, kapcsolatrendszerével, jelátvitelével kapcsolatos, vagy akár az idegsejtek és asztroglia sejtek közt zajló kommunikációt illető alapkutatói kérdések megválaszolására.

Az eredmények felhasználhatóak lehetnek az *in vivo* mérések hatékonyságának javításához is. A fentiek alapján az implantátum felület nanostrukturálása előnyös hatásokkal bírhat. Mivel a platina nem toxikus fém és impedanciája viszonylag alacsony, így gyakran használt kontaktusfelület az idegi implantátumok esetében. Az általunk végzett megfigyelések során mutatkozó, platinát illető negatív hatások a nanostrukturálás által biztosított fajlagos felületnövekedés, így impedancia-csökkenés miatt részben kompenzálódhatnak. Egy olyan eszköz, mely esetében implantátum felületén csupán a kontaktusok anyaga nanostrukturált platina, az ezen kívüli, jelentősen nagyobb Si (natív szilícium-oxid) vagy polikristályos Si implantátumfelület pedig szintén nanostrukturált, hosszú távon megbízhatóbban működhet, mint a sík felszínű implantátum. Az eszköz hosszú távú használatánál további előnyt jelenthet az oldalfalak technológiából adódó fluorokarbon polimer rétegének eltávolítása, a beültetést kísérő szöveti sérülés minimalizálás érdekében pedig megfontolandó lehet az eszköz vastagságának csökkentése. Az eszköz módosítási javaslatainak előnyeit krónikus *in vivo* jelregisztrálás igazolhatja.

## 7. Publikációs jegyzék

### 7.1. A tézisek alapjául szolgáló publikációk

[I] Z Fekete, Á Horváth, Zs Bérces, A Pongrácz, Black poly-silicon: a nanostructured seed layer for sensor applications, *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL* **216**: pp. 277-286. (2014)

[II] Zs Bérces, Á Horváth, A Jády, A Pongrácz, E Madarász, Z Fekete, Neural Cell Response to Nanostructured Biosensor Surfaces, *PROCEDIA ENGINEERING* **87**: pp. 971-974. (2014)

[III] Bérces Z, Csernyus B, Liliom H, Schlett K, Pinke D, Low P, Horváth Á, Fekete Z, Pongrácz A, Attachment of Primary Mouse Astroglial Cells on Neural Implant Surfaces, *PROCEDIA ENGINEERING* **168**: pp. 172-175. (2016)

[IV] Zs Bérces, K Tóth, G Márton, I Pál, B Kováts-Megyesi, Z Fekete, I Ulbert, A Pongrácz, Neurobiochemical changes in the vicinity of a nanostructured neural implant, *SCIENTIFIC REPORTS* **6**: Paper 35944. (2016)

### 7.2. Egyéb publikációk

#### 7.2.1. Folyóiratcikkek

A Pongrácz, Z Fekete, G Márton, Zs Bérces, I Ulbert, P Fűrjes, Deep-brain silicon multielectrodes for simultaneous neural recording and drug delivery, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 189, pp. 97–105. (2013)

Fekete Z, Pálfi E, Márton G, Handbauer M, Bérces Zs, Ulbert I, Pongrácz A, Négyessy L Combined *in vivo* recording of neural signals and iontophoretic injection of pathway tracers using a hollow silicon microelectrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 236: pp. 815-824. (2016)

#### 7.2.2. Nemzetközi konferencia-kiadvány

Z. Fekete, E. Pálfi, M. Handbauer, A. Pongrácz, Zs. Bérces, L. Négyessy, *In vivo* iontophoretic BDA injection through a buried microfluidic channel of a neural multielectrode, *Procedia Engineering*, Volume 120, pp. 464-467, (2015)

### 7.2.3. Poszterek

Zs Bérces, Z Fekete, G Márton, M Kiss, P Fürjes, I Ulbert, A Pongrácz, In vivo testing of silicon based neural multielectrodes with simultaneous drug delivery, Poster, **From Medicine To Bionics, 1st European Ph.D. Conference**, 2013., Budapest, Hungary

Zs Bérces, Z Fekete, A Pongrácz, Nanostructured Si Surfaces for Neural Application, Poster, **IBRO Workshop**, 2014., Debrecen, Hungary

Zs Bérces, Á Horváth, A Jády, A Pongrácz, E Madarász, Z Fekete, Neural cell response to nanostructured biosensor surfaces, Poster, **Euroensors 2014.**, Brescia, Italy

Zs. Bérces, Á. Horváth, A. Jády, A. Pongrácz, E. Madarász, Z. Fekete „Neural cell response to nanostructured surfaces”, **IEEE MNM EMBS 2014**, Turtle Bay, HI, USA

Zs Bérces, K Tóth, G Márton, B Kováts-Megyesi, Z Fekete, In Ulbert, A Pongrácz, Invivo investigation od cellular response to nanostructured implant surfaces, **IBRO Workshop 2016**, Budapest, Hungary

Zs. Bercses, J. Pomothy, A Zátonyi, Sz Barna, D Szegedi, Z Fekete, E Madarász, A Pongrácz Analysis of neural stem cell behavior on nanostructured implant surfaces, **IBRO Workshop 2016**, Budapest, Hungary

Zsófia Sztyéhlikné Bérces, Tímea Kőhidi, Judit Pomothy, Ágoston Horváth, Éva Benyei, Zoltán Fekete, Emília, Adhesion of neural progenitor and microglial cells on nanostructured surfaces; **FENS Regional Meeting 2017.** szeptember, Pécs, Hungary

### 7.2.4. Egyetemi konferencia-kiadványok

Zsófia Bérces, Neural cell response to nanostructured biosensor surfaces, **PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics**, pp. 59-62. (2014)

Zs Sztyéhlikné Bérces, Investigation of neural stem cells' response to nanostructured biosensor surfaces, **PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University** , G. Prószéky, P. Szolgay, Eds. Budapest: Pázmány University ePress, pp 93– 96. (2015)

Zsófia Sztyéhlikné Bérces, Bioactive properties of nanostructured surfaces, **PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics, Pázmány Péter Catholic University**, Vol. 11: pp. 111-114. (2016)

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, dr. Pongrácz Anitának és dr. Iván Kristófnak, hogy gondos kíséretükkel végezhettem PhD munkámat, és mindenben segítségemre voltak a kutatómunkában való elindulás és előrehaladás során!

Köszönöm a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karának oktatóinak és munkatársainak, hogy az egyetemei éveim elejétől fogva segítettek felkelteni tudásvágyamat a bionika területei iránt! Köszönöm a Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola vezetőségének, hogy befogadtak hallgatóik közé, így lehetővé téve és támogatva e munka elvégzését! Külön köszönöm Vida Tivadarnénak, hogy gondosságával és figyelmességével végigkísérte a haladásom menetét!

Köszönöm az MTA EK Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet igazgatóinak, különösen dr. Battistig Gábor osztályvezetőnek, hogy lehetőséget biztosítottak a számomra, hogy munkám során beletanulhassak a Mikrotechnológia Osztály működésébe, a tisztatéri munkába és használhassam a berendezéseket! Köszönöm továbbá az osztály minden munkatársának, akikkel volt szerencsém együtt dolgozni, különösen Erőss Magdolnának és Pajer Margitnak, hogy a labormunka során adódó bármilyen kérdésemmel fordulhattam hozzájuk, mindig örömmel, s készségesen segítettek, Hodován Róbertnek, aki munkája nélkül a minták nem jöhettek volna létre és Straszner Andrásnak a rengeteg segítséget a nanostruktúrák kialakításának technikai részleteiben! Kivételes köszönet illeti továbbá dr. Fekete Zoltánt, aki a munkában szereplő nanostrukturált felületek vizsgálatának projektjét megindította, és munkámat az elejétől a dolgozat megírásáig nagy gonddal kísérte végig, és rendkívül hasznos szakmai és gyakorlati tanácsokkal látott el. Köszönöm továbbá a projekten velem közösen dolgozó összes BSc és MSc hallgató munkáját, külön köszönettel tartozom Kiss Marcellnek, Horváth Ágostonnak, Csernyus Bencének, Kováts-Megyesi Bálintnak, Fritz Enikőnek és Zátanyi Anitának! Köszönöm dr. Márton Gergelynek minden segítségét mind az elektrokémiai mérésekkel való megismerkedésben, mind az *in vivo* műtétek elvégzésében!

Köszönet illeti a biológiai mérések során együttműködő partnerintézményeket és vezetőiket, akik nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka! Az *in vitro* össejt vizsgálatokért az MTA KOKI-ban elsősorban dr. Madarász Emiliának tartozom köszönettel, aki számos elfoglaltsága mellett szakított időt a témára, és nagy lelkesedéssel kísérte végig a munka menetét, valamint hatalmas segítségemre volt a steril munkába való betekintés, tanulás során, és bármilyen gyakorlati kérdésemmel is fordulhattam hozzá! Köszönöm továbbá Jády Attilának, hogy segítségével kezdődhetett meg a közös munkám a KOKI-val, valamint Pomothy Juditnak és Kőhidi Tímeának, akik segítsége a kísérletek megvalósításában és kiértékelésében pótolhatatlan volt!

Az *in vitro* primer sejtek vizsgálatok lehetőségéért, és a mérésekben való munkáért nagy köszönet illeti dr. Schlett Katalint és Liliom Hannát, akik hatalmas szakértelemmel és lelkesedéssel kezdtek bele a közös munkába, és akikkel rendkívül hatékonyan tudtunk együtt dolgozni! Dr. Lőw Péternek hálás vagyok a SEM mérések előkészítésében nyújtott segítségéért!

Az *in vivo* mérések lehetőségéért köszönettel tartozom az MTA TTK KPI-ban dr. Ulbert Istvánnak, valamint a munkánkban résztvevő minden intézeti munkatársnak! Külön köszönöm dr. Tóth Kinga munkáját és minden segítségét a metszetek előkészítésében és immunfestésében!

Hálás vagyok dr. Baji Zsófiának munkám alapos lektorálásáért!

Köszönöm az alábbi források támogatását, melyek nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre: KTIA\_13\_NAP-A-IV/1/2a/3/6; OTKA NN 116550, KAP 15-190- 3.3-ITK; KAP17-61005--1.1-ITK; EFOP-3.6.3-VEKOP- 16-2017-00002.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, akik egyetemi tanulmányaim során végig támogattak és lelkesítettek, valamint barátaimnak, akik jó élménnyé tették a mindennapi közös munkát! Köszönöm férjemnek, és kisfiamnak, hogy nagy türelemmel viselték e munka elkészültének időszakát!



## 9. Irodalomjegyzék

- [1] L. Vercueil *et al.*, “Deep brain stimulation in the treatment of severe dystonia,” *J. Neurol.*, vol. 248, no. 8, pp. 695–700, Aug. 2001.
- [2] G. Buzsáki *et al.*, “Tools for Probing Local Circuits: High-Density Silicon Probes Combined with Optogenetics,” *Neuron*, vol. 86, no. 1, pp. 92–105, Apr. 2015.
- [3] A. Hufnagel, W. Burr, C. E. Elger, J. Nadstawek, and G. Hefner, “Localization of the Epileptic Focus During Methohexital-Induced Anesthesia,” *Epilepsia*, vol. 33, no. 2, pp. 271–284, Mar. 1992.
- [4] M. J. Farrer, “Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, no. 4, pp. 306–318, Apr. 2006.
- [5] J. Jankovic, “Essential tremor: A heterogenous disorder,” *Mov. Disord.*, vol. 17, no. 4, pp. 638–644, Jul. 2002.
- [6] J. Thelin *et al.*, “Implant Size and Fixation Mode Strongly Influence Tissue Reactions in the CNS,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16267, Jan. 2011.
- [7] T. D. Y. Kozai *et al.*, “Mechanical failure modes of chronically implanted planar silicon-based neural probes for laminar recording,” *Biomaterials*, vol. 37, pp. 25–39, Jan. 2015.
- [8] J. R. Eles, A. L. Vazquez, T. D. Y. Kozai, and X. T. Cui, “In vivo imaging of neuronal calcium during electrode implantation: Spatial and temporal mapping of damage and recovery,” *Biomaterials*, vol. 174, pp. 79–94, Aug. 2018.
- [9] R. W. Griffith and D. R. Humphrey, “Long-term gliosis around chronically implanted platinum electrodes in the Rhesus macaque motor cortex,” *Neurosci. Lett.*, vol. 406, pp. 81–86, Oct. 2006.
- [10] S. F. Cogan, “Neural Stimulation and Recording Electrodes,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 10, no. 1, pp. 275–309, Aug. 2008.
- [11] J. C. Barrese *et al.*, “Failure mode analysis of silicon-based intracortical microelectrode arrays in non-human primates,” *J. Neural Eng.*, vol. 10, no. 6, p. 66014, Dec. 2013.
- [12] D. J. Edell, V. V. Toi, V. M. McNeil, and L. D. Clark, “Factors influencing the biocompatibility of insertable silicon microshafts in cerebral cortex,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 39, no. 6, pp. 635–643, Jun. 1992.
- [13] C. S. Bjornsson *et al.*, “Effects of insertion conditions on tissue strain and vascular damage during neuroprosthetic device insertion,” *J. Neural Eng.*, vol. 3, no. 3, pp. 196–207, Sep. 2006.
- [14] T. D. Y. Kozai *et al.*, “Reduction of neurovascular damage resulting from microelectrode insertion into the cerebral cortex using *in vivo* two-photon mapping,” *J. Neural Eng.*, vol. 7, no. 4, p. 46011, Aug. 2010.
- [15] T. D. Y. Kozai, A. S. Jaquins-Gerstl, A. L. Vazquez, A. C. Michael, and X. T. Cui, “Brain Tissue Responses to Neural Implants Impact Signal Sensitivity and Intervention Strategies,” *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 6, no. 1, pp. 48–67, Jan. 2015.
- [16] D. H. Szarowski *et al.*, “Brain responses to micro-machined silicon devices,” *Brain Res.*, vol. 983, no. 1–2, pp. 23–35, Sep. 2003.
- [17] M. Welkenhuysen, A. Andrei, L. Ameye, W. Eberle, and B. Nuttin, “Effect of Insertion Speed on Tissue Response and Insertion Mechanics of a Chronically Implanted Silicon-Based Neural Probe,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 58, no. 11, pp. 3250–3259, Nov. 2011.

- [18] A. A. Sharp, A. M. Ortega, D. Restrepo, D. Curran-Everett, and K. Gall, “*In Vivo* Penetration Mechanics and Mechanical Properties of Mouse Brain Tissue at Micrometer Scales,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 56, no. 1, pp. 45–53, Jan. 2009.
- [19] R. Biran, D. C. Martin, and P. A. Tresco, “The brain tissue response to implanted silicon microelectrode arrays is increased when the device is tethered to the skull,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 82, no. 1, pp. 169–178, Jul. 2007.
- [20] A. Gilletti and J. Muthuswamy, “Brain micromotion around implants in the rodent somatosensory cortex,” *J. Neural Eng.*, vol. 3, no. 3, pp. 189–195, Sep. 2006.
- [21] P. J. Rousche and R. A. Normann, “A method for pneumatically inserting an array of penetrating electrodes into cortical tissue,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 20, no. 4, pp. 413–422, Jul. 1992.
- [22] L. Grand *et al.*, “Short and long term biocompatibility of NeuroProbes silicon probes,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 189, no. 2, pp. 216–29, Jun. 2010.
- [23] L. E. Fonyó Attila, *Az orvosi élettan tankönyve*, 7. kiadás. Medicina Könyvkiadó, 2014. ISBN: 978 963 226 504 9
- [24] R. F. Schmidt and G. Thews, *Human Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, 1989.
- [25] R. P. Vertes and R. W. Stackman, *Electrophysiological recording techniques*. Humana Press, 2011.
- [26] H. K. Kimelberg and M. Nedergaard, “Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets,” *Neurotherapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 338–53, Oct. 2010.
- [27] A. Verkhratsky and A. M. Butt, *Glial physiology and pathophysiology: a handbook*. John Wiley & Sons, 2013. ISBN: 978-0-470-97853-5
- [28] C. Giaume, A. Koulakoff, L. Roux, D. Holcman, and N. Rouach, “Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 11, no. 2, pp. 87–99, Feb. 2010.
- [29] C. Giaume and X. Liu, “From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking,” *J. Physiol.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 34–39, Jan. 2012.
- [30] A. H. Cornell-Bell, S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper, and S. J. Smith, “Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling,” *Science*, vol. 247, no. 4941, pp. 470–3, Jan. 1990.
- [31] S. Kirischuk, V. Parpura, and A. Verkhratsky, “Sodium dynamics: another key to astroglial excitability?,” *Trends Neurosci.*, vol. 35, no. 8, pp. 497–506, Aug. 2012.
- [32] G. Seifert and C. Steinhäuser, “Ion channels in astrocytes,” in *Glial ⇌ Neuronal Signaling*, Boston, MA: Springer US, 2004, pp. 187–213.
- [33] A. Verkhratsky and C. Steinhäuser, “Ion channels in glial cells,” *Brain Res. Rev.*, vol. 32, no. 2–3, pp. 380–412, Apr. 2000.
- [34] V. Parpura, V. Grubišić, and A. Verkhratsky, “Ca<sup>2+</sup> sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 5, pp. 984–991, May 2011.
- [35] A. Verkhratsky, J. J. Rodríguez, and V. Parpura, “Calcium signalling in astroglia,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 353, no. 1–2, pp. 45–56, Apr. 2012.
- [36] S. M. Finkbeiner, “Glial calcium,” *Glia*, vol. 9, no. 2, pp. 83–104, Oct. 1993.
- [37] A. Verkhratsky and H. Kettenmann, “Calcium signalling in glial cells,” *Trends Neurosci.*, vol. 19, no. 8, pp. 346–352, Aug. 1996.
- [38] A. Verkhratsky, “Physiology of neuronal–glial networking,” *Neurochem. Int.*, vol. 57,

no. 4, pp. 332–343, Nov. 2010.

- [39] A. G. Orr, A. L. Orr, X.-J. Li, R. E. Gross, and S. F. Traynelis, “Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction,” *Nat. Neurosci.*, vol. 12, no. 7, pp. 872–878, Jul. 2009.
- [40] D. Boison, J.-F. Chen, and B. B. Fredholm, “Adenosine signaling and function in glial cells,” *Cell Death Differ.*, vol. 17, no. 7, pp. 1071–1082, Jul. 2010.
- [41] N. C. Danbolt, “Glutamate uptake,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 1–105, Sep. 2001.
- [42] V. Eulenburg and J. Gomeza, “Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function,” *Brain Res. Rev.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 103–112, May 2010.
- [43] M. Zonta *et al.*, “Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation,” *Nat. Neurosci.*, vol. 6, no. 1, pp. 43–50, Jan. 2003.
- [44] A. Suzuki *et al.*, “Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 810–823, Mar. 2011.
- [45] M. Simard and M. Nedergaard, “The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis,” *Neuroscience*, vol. 129, no. 4, pp. 877–896, Jan. 2004.
- [46] H. K. Kimelberg, “Water homeostasis in the brain: Basic concepts,” *Neuroscience*, vol. 129, no. 4, pp. 851–860, Jan. 2004.
- [47] T. Mori, A. Buffo, and M. Götz, “The Novel Roles of Glial Cells Revisited: The Contribution of Radial Glia and Astrocytes to Neurogenesis,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 69, pp. 67–99, Jan. 2005.
- [48] C. Eroglu and B. A. Barres, “Regulation of synaptic connectivity by glia,” *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 223–231, Nov. 2010.
- [49] F. W. Pfrieger, “Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses,” *Brain Res. Rev.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 39–46, May 2010.
- [50] M. Nedergaard, B. Ransom, and S. A. Goldman, “New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain,” *Trends Neurosci.*, vol. 26, no. 10, pp. 523–530, Oct. 2003.
- [51] E. A. Bushong, M. E. Martone, Y. Z. Jones, and M. H. Ellisman, “Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains,” *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 1, pp. 183–192, Jan. 2002.
- [52] M. O’Donnell, R. K. Chance, and G. J. Bashaw, “Axon Growth and Guidance: Receptor Regulation and Signal Transduction,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 32, no. 1, pp. 383–412, Jun. 2009.
- [53] RIO-HORTEGA and del P., “Microglia,” *Cytol. Cell. Pathol. Nerv. Syst.*, pp. 482–534, 1932.
- [54] H. Kettenmann, U.-K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, “Physiology of Microglia,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 461–553, Apr. 2011.
- [55] J. M. Pockock and H. Kettenmann, “Neurotransmitter receptors on microglia,” *Trends Neurosci.*, vol. 30, no. 10, pp. 527–535, Oct. 2007.
- [56] H. Liu, R. K. Leak, and X. Hu, “Neurotransmitter receptors on microglia,” *BMJ*, vol. 1, no. 2, pp. 52–58, Jun. 2016.
- [57] G. Burnstock and A. Verkhratsky, “Evolutionary origins of the purinergic signalling system,” *Acta Physiol.*, vol. 195, no. 4, pp. 415–447, Apr. 2009.

- [58] Y. B. Lee, A. Nagai, and S. U. Kim, “Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 69, no. 1, pp. 94–103, Jul. 2002.
- [59] U.-K. Hanisch, T. V. Johnson, and J. Kipnis, “Toll-like receptors: roles in neuroprotection?,” *Trends Neurosci.*, vol. 31, no. 4, pp. 176–182, Apr. 2008.
- [60] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, “Astrocytes: biology and pathology,” *Acta Neuropathol.*, vol. 119, no. 1, pp. 7–35, Jan. 2010.
- [61] M. V. Sofroniew, “Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation,” *Trends Neurosci.*, vol. 32, no. 12, pp. 638–647, Dec. 2009.
- [62] S. Robel, B. Berninger, and M. Götz, “The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 2, pp. 88–104, Feb. 2011.
- [63] M. V. Sofroniew, “Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation,” *Trends Neurosci.*, vol. 32, no. 12, pp. 638–47, Dec. 2009.
- [64] A. J. Mathewson and M. Berry, “Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats,” *Brain Res.*, vol. 327, no. 1–2, pp. 61–69, Feb. 1985.
- [65] W. L. Maxwell, R. Follows, D. E. Ashhurst, and M. Berry, “The response of the cerebral hemisphere of the rat to injury. I. The mature rat,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 328, no. 1250, pp. 479–500, Jun. 1990.
- [66] I. Hozumi, F.-C. Chiu, and W. T. Norton, “Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds,” *Brain Res.*, vol. 524, no. 1, pp. 64–71, Jul. 1990.
- [67] U.-K. Hanisch, “Microglia as a source and target of cytokines,” *Glia*, vol. 40, no. 2, pp. 140–155, Nov. 2002.
- [68] M. Eddleston and L. Mucke, “Molecular profile of reactive astrocytes—Implications for their role in neurologic disease,” *Neuroscience*, vol. 54, no. 1, pp. 15–36, May 1993.
- [69] J. A. Brodkey, M. A. Gates, E. D. Laywell, and D. A. Steindler, “The Complex Nature of Interactive Neuroregeneration-Related Molecules,” *Exp. Neurol.*, vol. 123, no. 2, pp. 251–270, Oct. 1993.
- [70] M. Dihné, C. Grommes, M. Lutzenburg, O. W. Witte, and F. Block, “Different mechanisms of secondary neuronal damage in thalamic nuclei after focal cerebral ischemia in rats,” *Stroke*, vol. 33, no. 12, pp. 3006–11, Dec. 2002.
- [71] A. Verkhratsky *et al.*, “Neurological Diseases as Primary Gliopathies: A Reassessment of Neurocentrism,” *ASN Neuro*, vol. 4, no. 3, p. AN20120010, Mar. 2012.
- [72] J. B. Cavanagh, “The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain,” *J. Anat.*, vol. 106, no. Pt 3, pp. 471–87, May 1970.
- [73] D. Schiffer, M. T. Giordana, P. Cavalla, M. C. Vigliani, and A. Attanasio, “Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat: Double stainings and markers of cell proliferation,” *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 11, no. 2, pp. 269–280, Apr. 1993.
- [74] J. Frisén, C. B. Johansson, C. Török, M. Risling, and U. Lendahl, “Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury,” *J. Cell Biol.*, vol. 131, no. 2, pp. 453–64, Oct. 1995.
- [75] S. Holmin, P. Almqvist, U. Lendahl, and T. Mathiesen, “Adult Nestin-expressing Subependymal Cells Differentiate to Astrocytes in Response to Brain Injury,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 9, no. 1, pp. 65–75, Jan. 1997.
- [76] F. H. Gage, “Mammalian neural stem cells,” *Science*, vol. 287, no. 5457, pp. 1433–8,

Feb. 2000.

- [77] A. Gritti *et al.*, “Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents,” *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 2, pp. 437–45, Jan. 2002.
- [78] C. Schmidt-Hieber, P. Jonas, and J. Bischofberger, “Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus,” *Nature*, vol. 429, no. 6988, pp. 184–187, May 2004.
- [79] E. Madarász, “Diversity of Neural Stem/Progenitor Populations: Varieties by Age, Regional Origin and Environment,” in *Neural Stem Cells - New Perspectives*, InTech, 2013.
- [80] K. Takasawa *et al.*, “Increased Proliferation of Neural Progenitor Cells but Reduced Survival of Newborn Cells in the Contralateral Hippocampus after Focal Cerebral Ischemia in Rats,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 22, no. 3, pp. 299–307, Mar. 2002.
- [81] A. Arvidsson, T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia, and O. Lindvall, “Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke,” *Nat. Med.*, vol. 8, no. 9, pp. 963–970, Aug. 2002.
- [82] Y. Tozuka, S. Fukuda, T. Namba, T. Seki, and T. Hisatsune, “GABAergic Excitation Promotes Neuronal Differentiation in Adult Hippocampal Progenitor Cells,” *Neuron*, vol. 47, no. 6, pp. 803–815, Sep. 2005.
- [83] P. Taupin and F. H. Gage, “Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 69, no. 6, pp. 745–749, Sep. 2002.
- [84] H. van Praag, A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer, and F. H. Gage, “Functional neurogenesis in the adult hippocampus,” *Nature*, vol. 415, no. 6875, pp. 1030–1034, Feb. 2002.
- [85] K. von der Mark, J. Park, S. Bauer, and P. Schmuki, “Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix,” *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 131–153, Jan. 2010.
- [86] F. Berthiaume, P. V. Moghe, M. Toner, and M. L. Yarmush, “Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration,” *FASEB J.*, vol. 10, no. 13, pp. 1471–84, Nov. 1996.
- [87] D.-H. H. Kim, P. P. Provenzano, C. L. Smith, and A. Levchenko, “Matrix nanotopography as a regulator of cell function,” *J. Cell Biol.*, vol. 197, no. 3, pp. 351–360, Apr. 2012.
- [88] J. L. Ridet, A. Privat, S. K. Malhotra, and F. H. Gage, “Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function,” *Trends Neurosci.*, vol. 20, no. 12, pp. 570–577, Dec. 1997.
- [89] R. Donato, “Intracellular and extracellular roles of S100 proteins,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 60, no. 6, pp. 540–551, Apr. 2003.
- [90] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson, “Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2006.
- [91] M. C. Morganti-Kossmann, T. Kossmann, and S. M. Wahl, “Cytokines and neuropathology,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 13, pp. 286–291, Jan. 1992.
- [92] A. S. . Curtis, B. Casey, J. . Gallagher, D. Pasqui, M. . Wood, and C. D. . Wilkinson, “Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important?,” *Biophys. Chem.*, vol. 94, no. 3, pp. 275–283, Dec. 2001.

- [93] A. S. G. Curtis, N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson, and G. Aitchison, "Cells React to Nanoscale Order and Symmetry in Their Surroundings," *IEEE Trans. Nanobioscience*, vol. 3, no. 1, pp. 61–65, Mar. 2004.
- [94] B. Zhu *et al.*, "Nanotopographical guidance of C6 glioma cell alignment and oriented growth," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4215–4223, Aug. 2004.
- [95] M. J. Dalby *et al.*, "The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder," *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 12, pp. 997–1003, Dec. 2007.
- [96] E. K. F. Yim, S. W. Pang, and K. W. Leong, "Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage," *Exp. Cell Res.*, vol. 313, no. 9, pp. 1820–1829, May 2007.
- [97] C. J. J. Bettinger, R. Langer, and J. T. T. Borenstein, "Engineering substrate topography at the Micro- and nanoscale to control cell function," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 30, pp. 5406–5415, Jul. 2009.
- [98] M. J. P. Biggs, R. G. Richards, N. Gadegaard, C. D. W. Wilkinson, R. O. C. Oreffo, and M. J. Dalby, "The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1+ enriched skeletal stem cells," *Biomaterials*, vol. 30, no. 28, pp. 5094–5103, Oct. 2009.
- [99] M. J. P. Biggs, R. G. Richards, and M. J. Dalby, "Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 5, pp. 619–633, Oct. 2010.
- [100] E. Bressan *et al.*, "Nanostructured Surfaces of Dental Implants," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 1918–1931, Jan. 2013.
- [101] S. C. Bayliss, L. D. Buckberry, P. J. Harris, and M. Tobin, "Nature of the Silicon-Animal Cell Interface," *J. Porous Mater.*, vol. 7, no. 1/3, pp. 191–195, 2000.
- [102] M. J. Dalby, S. J. Yarwood, M. O. Riehle, H. J. H. Johnstone, S. Affrossman, and A. S. G. Curtis, "Increasing Fibroblast Response to Materials Using Nanotopography: Morphological and Genetic Measurements of Cell Response to 13-nm-High Polymer Demixed Islands," *Exp. Cell Res.*, vol. 276, no. 1, pp. 1–9, May 2002.
- [103] A.-S. Andersson, F. Bäckhed, A. von Euler, A. Richter-Dahlfors, D. Sutherland, and B. Kasemo, "Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production," *Biomaterials*, vol. 24, no. 20, pp. 3427–3436, Sep. 2003.
- [104] C. P. Pennisi *et al.*, "Responses of fibroblasts and glial cells to nanostructured platinum surfaces," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 38, p. 385103, Sep. 2009.
- [105] F. Zamani, M. Amani-Tehran, M. Latifi, and M. A. Shokrgozar, "The influence of surface nanoroughness of electrospun PLGA nanofibrous scaffold on nerve cell adhesion and proliferation," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 6, pp. 1551–1560, Jun. 2013.
- [106] M. J. Dalby, D. Pasqui, and S. Affrossman, "Cell response to nano-islands produced by polymer demixing: a brief review," *IEE Proc. - Nanobiotechnology*, vol. 151, no. 2, p. 53, Apr. 2004.
- [107] S. Turner, L. Kam, M. Isaacson, H. G. Craighead, W. Shain, and J. Turner, "Cell attachment on silicon nanostructures," *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.*, vol. 15, no. 6, p. 2848, Nov. 1997.
- [108] S. C. Bayliss, L. D. Buckberry, I. Fletcher, and M. J. Tobin, "Culture of neurons on silicon," *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 74, no. 1, pp. 139–142, 1999.
- [109] A. M. P. Turner *et al.*, "Attachment of astroglial cells to microfabricated pillar arrays

- of different geometries,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 430–441, Sep. 2000.
- [110] Y. W. Fan, F. Z. Cui, L. N. Chen, Y. Zhai, Q. Y. Xu, and I.-S. S. Lee, “Adhesion of neural cells on silicon wafer with nano-topographic surface,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 187, no. 3–4, pp. 313–318, Feb. 2002.
- [111] Y. W. W. Fan, F. Z. Z. Cui, S. P. P. Hou, Q. Y. Y. Xu, L. N. N. Chen, and I.-S. I.-S. Lee, “Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 120, no. 1, pp. 17–23, Oct. 2002.
- [112] K. A. K. A. Moxon, N. M. N. M. Kalkhoran, M. Markert, M. A. M. A. Sambito, J. L. L. McKenzie, and J. T. T. Webster, “Nanostructured surface modification of ceramic-based microelectrodes to enhance biocompatibility for a direct brain-machine interface,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 6, pp. 881–889, Jun. 2004.
- [113] S. P. Khan, G. G. Auner, and G. M. Newaz, “Influence of nanoscale surface roughness on neural cell attachment on silicon,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 1, no. 2, pp. 125–129, Jun. 2005.
- [114] A. V. Sapelkin, S. C. Bayliss, B. Unal, and A. Charalambou, “Interaction of B50 rat hippocampal cells with stain-etched porous silicon,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 6, pp. 842–846, Feb. 2006.
- [115] W. Hällström *et al.*, “Gallium phosphide nanowires as a substrate for cultured neurons,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 10, pp. 2960–2965, 2007.
- [116] G. Piret, M. T. Perez, and C. N. Prinz, “Neurite outgrowth and synaptophysin expression of postnatal CNS neurons on GaP nanowire arrays in long-term retinal cell culture,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 4, pp. 875–887, Jan. 2013.
- [117] D. B. Suyatin *et al.*, “Nanowire-Based Electrode for Acute In Vivo Neural Recordings in the Brain,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, pp. 1–8, Feb. 2013.
- [118] K. A. Moxon, S. Hallman, A. Aslani, N. M. Kalkhoran, and P. I. Lelkes, “Bioactive properties of nanostructured porous silicon for enhancing electrode to neuron interfaces,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 18, no. 10, pp. 1263–1281, Jan. 2007.
- [119] T. D. Y. Kozai *et al.*, “Chronic In Vivo Evaluation of PEDOT / CNT for Stable Neural Recordings,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 63, no. 1, pp. 111–119, Jan. 2016.
- [120] S. Bechara, L. Wadman, and K. C. Papat, “Electroconductive polymeric nanowire templates facilitates in vitro C17.2 neural stem cell line adhesion, proliferation and differentiation,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 7, pp. 2892–2901, Jul. 2011.
- [121] M. Antensteiner and M. R. Abidian, “Tunable nanostructured conducting polymers for neural interface applications,” in *2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 2017, pp. 1881–1884.
- [122] K. A. Ludwig, J. D. Uram, J. Yang, D. C. Martin, and D. R. Kipke, “Chronic neural recordings using silicon microelectrode arrays electrochemically deposited with a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film,” *J. Neural Eng.*, vol. 3, no. 1, pp. 59–70, Mar. 2006.
- [123] K. A. Ludwig, N. B. Langhals, M. D. Joseph, S. M. Richardson-Burns, J. L. Hendricks, and D. R. Kipke, “Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) polymer coatings facilitate smaller neural recording electrodes,” *J. Neural Eng.*, vol. 8, no. 1, p. 14001, Feb. 2011.
- [124] L. Kam, W. Shain, J. N. N. Turner, and R. Bizios, “Selective adhesion of astrocytes to surfaces modified with immobilized peptides,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 2, pp. 511–515, Jan. 2002.

- [125] R. Biran, M. D. Noble, and P. A. Tresco, "Directed nerve outgrowth is enhanced by engineered glial substrates," *Exp. Neurol.*, vol. 184, no. 1, pp. 141–152, Nov. 2003.
- [126] W. He, G. C. McConnell, and R. V. Bellamkonda, "Nanoscale laminin coating modulates cortical scarring response around implanted silicon microelectrode arrays," *J. Neural Eng.*, vol. 3, no. 4, pp. 316–26, Dec. 2006.
- [127] E. Azemi, C. F. Lagenaur, and X. T. Cui, "The surface immobilization of the neural adhesion molecule L1 on neural probes and its effect on neuronal density and gliosis at the probe/tissue interface," *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 681–692, 2011.
- [128] X. Cui *et al.*, "Surface modification of neural recording electrodes with conducting polymer/biomolecule blends," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 56, no. 2, pp. 261–272, Aug. 2001.
- [129] M. R. Abidian, K. A. Ludwig, T. C. Marzullo, D. C. Martin, and D. R. Kipke, "Interfacing conducting polymer nanotubes with the central nervous system: chronic neural recording using poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanotubes," *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 37, pp. 3764–3770, Oct. 2009.
- [130] J. B. Marroquin *et al.*, "Neural Electrodes Based on 3D Organic Electroactive Microfibers," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 1700927, p. 1700927, Aug. 2017.
- [131] L. Spataro *et al.*, "Dexamethasone treatment reduces astroglia responses to inserted neuroprosthetic devices in rat neocortex," *Exp. Neurol.*, vol. 194, no. 2, pp. 289–300, Aug. 2005.
- [132] Y. Zhong and R. V. Bellamkonda, "Controlled release of anti-inflammatory agent  $\alpha$ -MSH from neural implants," *J. Control. Release*, vol. 106, no. 3, pp. 309–318, Sep. 2005.
- [133] W. J. Streit, "The role of microglia in brain injury," *Neurotoxicology*, vol. 17, no. 3–4, pp. 671–8, 1996.
- [134] W. J. Streit, S. A. Walter, and N. A. Pennell, "Reactive microgliosis," *Prog. Neurobiol.*, vol. 57, no. 6, pp. 563–581, Apr. 1999.
- [135] J. P. Harris *et al.*, "Mechanically adaptive intracortical implants improve the proximity of neuronal cell bodies," *J. Neural Eng.*, vol. 8, no. 6, p. 66011, Oct. 2011.
- [136] A. Lecomte, A. Degache, E. Descamps, L. Dahan, and C. Bergaud, "In vitro and in vivo biostability assessment of chronically-implanted Parylene C neural sensors," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 251, pp. 1001–1008, Nov. 2017.
- [137] K. C. Spencer, J. C. Sy, K. B. Ramadi, A. M. Graybiel, R. Langer, and M. J. Cima, "Characterization of Mechanically Matched Hydrogel Coatings to Improve the Biocompatibility of Neural Implants," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–16, Dec. 2017.
- [138] C. Hassler, T. Boretius, and T. Stieglitz, "Polymers for neural implants," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 49, no. 1, pp. 18–33, Jan. 2011.
- [139] A. Mercanzini *et al.*, "Demonstration of cortical recording using novel flexible polymer neural probes," *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 143, no. 1, pp. 90–96, May 2008.
- [140] P. M. George *et al.*, "Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics," *Biomaterials*, vol. 26, no. 17, pp. 3511–3519, Jun. 2005.
- [141] J. Subbaroyan, D. C. Martin, and D. R. Kipke, "A finite-element model of the mechanical effects of implantable microelectrodes in the cerebral cortex," *J. Neural Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 103–113, Dec. 2005.
- [142] P. Stice, A. Gilletti, A. Panitch, and J. Muthuswamy, "Thin microelectrodes reduce GFAP expression in the implant site in rodent somatosensory cortex," *J. Neural Eng.*,



vol. 4, no. 2, pp. 42–53, Jun. 2007.

- [143] B. Rubehn, S. B. E. Wolff, P. Tovote, A. Lüthi, and T. Stieglitz, “A polymer-based neural microimplant for optogenetic applications: design and first in vivo study,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 4, p. 579, Jan. 2013.
- [144] K. Lee, J. He, R. Clement, S. Massia, and B. Kim, “Biocompatible benzocyclobutene (BCB)-based neural implants with micro-fluidic channel,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 2, pp. 404–407, Sep. 2004.
- [145] S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, and T. Suzuki, “Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels,” *Lab Chip*, vol. 5, no. 5, p. 519, Apr. 2005.
- [146] A. Altuna *et al.*, “SU-8 based microprobes for simultaneous neural depth recording and drug delivery in the brain,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 7, p. 1422, Mar. 2013.
- [147] K.-K. Lee *et al.*, “Polyimide-based intracortical neural implant with improved structural stiffness,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 14, no. 1, pp. 32–37, Jan. 2004.
- [148] T. D. Y. Kozai and D. R. Kipke, “Insertion shuttle with carboxyl terminated self-assembled monolayer coatings for implanting flexible polymer neural probes in the brain,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 184, no. 2, pp. 199–205, Nov. 2009.
- [149] S. Takeuchi, Y. Yoshida, D. Ziegler, K. Mabuchi, and T. Suzuki, “Parylene flexible neural probe with micro fluidic channel,” in *17th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems. Maastricht MEMS 2004 Technical Digest*, pp. 208–211.
- [150] D. R. Kipke, D. S. Pellinen, and R. J. Vetter, “Advanced neural implants using thin-film polymers,” in *2002 IEEE International Symposium on Circuits and Systems. Proceedings (Cat. No.02CH37353)*, vol. 4, p. IV-173-IV-176.
- [151] J. C. Williams, R. L. Rennaker, and D. R. Kipke, “Long-term neural recording characteristics of wire microelectrode arrays implanted in cerebral cortex,” *Brain Res. Protoc.*, vol. 4, no. 3, pp. 303–313, Dec. 1999.
- [152] J. Bartels *et al.*, “Neurotrophic electrode: method of assembly and implantation into human motor speech cortex,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 174, no. 2, pp. 168–76, Sep. 2008.
- [153] S. Musallam, M. J. Bak, P. R. Troyk, and R. A. Andersen, “A floating metal microelectrode array for chronic implantation,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 160, no. 1, pp. 122–127, Feb. 2007.
- [154] R. L. Rennaker, A. M. Ruyle, S. E. Street, and A. M. Sloan, “An economical multi-channel cortical electrode array for extended periods of recording during behavior,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 142, no. 1, pp. 97–105, Mar. 2005.
- [155] G. Buzsáki, “Large-scale recording of neuronal ensembles,” *Nat. Neurosci.*, vol. 7, no. 5, pp. 446–451, May 2004.
- [156] M. J. Madou, *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology*. CRC Press, 2012. ISBN: 9780849331800
- [157] “CleWin Layout Software.” [Online]. Available: <http://www.wieweb.com/ns6/index.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [158] Franz Laermer, Andrea Schilp, “Method of anisotropically etching silicon, US5501893A, US Grant,” 27-Nov-1993.
- [159] R. Vishavkarma, S. Raghavan, C. Kuyyamudi, A. Majumder, J. Dhawan, and P. A. Pullarkat, “Role of Actin Filaments in Correlating Nuclear Shape and Cell Spreading”

*PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e107895, Sep. 2014.

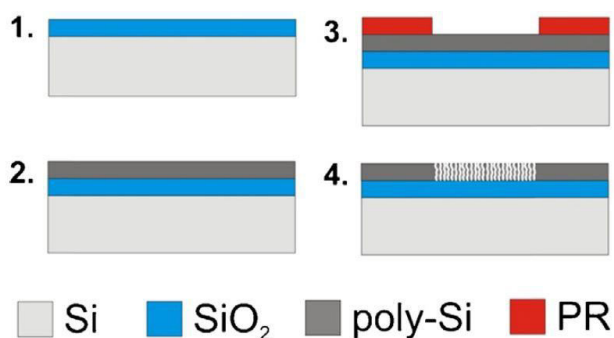
- [160] D.-H. Kim, B. Li, F. Si, J. M. Phillip, D. Wirtz, and S. X. Sun, “Volume regulation and shape bifurcation in the cell nucleus,” *J. Cell Sci.*, vol. 128, no. 18, pp. 3375–3385, Sep. 2015.
- [161] S. Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, Jun. 2007.
- [162] H. V Jansen *et al.*, “Black silicon method XI: oxygen pulses in SF6 plasma,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 20, no. 7, p. 75027, Jul. 2010.
- [163] H. Jansen, M. de Boer, R. Legtenberg, and M. Elwenspoek, “The black silicon method: a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 5, no. 2, p. 115, Jun. 1995.
- [164] “LPCVD Tempress | PTA | Upstream Technological Platform.” [Online]. Available: <http://pta-grenoble.com/facilities/lpcvd-tempress>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [165] “NanoFab Tool: Oxford Plasmalab 100 Inductively Coupled Plasma (ICP) Etcher 2 | NIST.” [Online]. Available: <https://www.nist.gov/laboratories/tools-instruments/nanofab-tool-oxford-plasmalab-100-inductively-coupled-plasma-icp>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [166] “D8 DISCOVER Family - X-ray Powder Diffractometer, DAVINCI.DESIGN - X-ray Diffraction and Scattering, XRD, Powder | AXS Bruker | Bruker.” [Online]. Available: <https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/x-ray-diffraction/d8-discover-family.html>. [Accessed: 04-Jul-2018].
- [167] “ZEISS SEM - Field Emission Scanning Electron Microscope.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/scanning-electron-microscopes/geminisem.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [168] J. Schindelin *et al.*, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012.
- [169] K. D. Wise, J. B. Angell, and A. Starr, “An Integrated-Circuit Approach to Extracellular Microelectrodes,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. BME-17, no. 3, pp. 238–247, Jul. 1970.
- [170] “Reference 600+ Potentiostat/Galvanostat 5 MHz EIS.” [Online]. Available: <https://www.gamry.com/potentiostats/reference-600-plus/>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [171] “RINGER LACTATE - Essential drugs.” [Online]. Available: <https://medicalguidelines.msf.org/viewport/EssDr/english/ringer-lactate-16687689.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [172] “Potentiostat/Electrochemical Instrument Software for Gamry Instruments.” [Online]. Available: <https://www.gamry.com/support/software/>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [173] J. M. Doña Rodríguez, J. A. Herrera Melián, and J. Pérez Peña, “Determination of the Real Surface Area of Pt Electrodes by Hydrogen Adsorption Using Cyclic Voltammetry,” *J. Chem. Educ.*, vol. 77, no. 9, p. 1195, Sep. 2000.
- [174] BioLogic Science Instruments, “Calculation of the platinum’s active surface, Application Note.” [Online]. Available: [www.bio-logic.info](http://www.bio-logic.info). [Accessed: 26-Jun-2018].
- [175] “Tecan – Infinite F50.” [Online]. Available: [https://ww3.tecan.com/platform/apps/virtualldirectories/f50\\_green/](https://ww3.tecan.com/platform/apps/virtualldirectories/f50_green/). [Accessed: 30-Jun-2018].
- [176] “Tecan Spark Multimode microplate reader, Live cell assays.” [Online]. Available: <https://lifesciences.tecan.com/multimode-plate-reader>. [Accessed: 30-Jun-2018].

- [177] “IBM SPSS Statistics V22.0.” [Online]. Available: <http://www-01.ibm.com/common/ssi/cgi-bin/ssialias?subtype=ca&infotype=an&appname=iSource&supplier=897&letternum=ENUS213-309>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [178] W. W. Daniel, *Biostatistics : a foundation for analysis in the health sciences*. J. Wiley & Sons, 2009. ISBN: 9780470105825
- [179] D. Elek, *Biometria az orvosi gyakorlatban*. Medicina Könyvkiadó, 2011. ISBN: 978 963 226 641 1
- [180] “Axio Vert.A1 for Biology - The Inverted Microscope for Advanced Routine Tasks.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/us/products/light-microscopes/axio-vert-a1-for-biology.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [181] “Free Microscope Software ZEN lite from ZEISS Microscopy.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen-lite.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [182] “Zeiss Axiovert 200M Fluorescence/Live cell Imaging Microscope | National Center for X-ray Tomography.” [Online]. Available: <http://next.lbl.gov/node/705>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [183] “AxioVision Microscope Software for Materials Microscopy & Industrial Applications.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/axiovision.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [184] “ZEISS AxioCam Microscope Cameras for Science and Research.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-cameras.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [185] H. L. Liliom, “A protein kináz D szerepének vizsgálata az idegsejtek pusztulását előidéző hatások alatt,” Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola, 2018.
- [186] “Zeiss Axio Observer - Your open and flexible inverted microscope platform.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/light-microscopes/axio-observer-for-biology.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [187] “Zeiss Flexible light source Colibri 7.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-components/lightsources/colibri-7.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [188] “Kopf Stereotaxic Instruments.” [Online]. Available: <http://kopfstruments.com/>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [189] “Leica VT1200 S | Automated Vibratome - Product: Leica Biosystems.” [Online]. Available: <https://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/sliding-and-vibrating-blade-microtomes/vibrating-blade-microtome/products/leica-vt1200-s/>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [190] “Axio Scope for Intravital Microscopy and Cytology Testing.” [Online]. Available: <https://www.zeiss.com/microscopy/us/products/light-microscopes/axio-scope-a1-for-biology.html>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [191] “JAI GO Series GO-5000M-PGE | GO-5000C-PGE GigE cameras.” [Online]. Available: <https://www.1stvision.com/cameras/models/JAI/GO-5000M-PGE%7C%20GO-5000C-PGE>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [192] H. V Jansen, M. J. de Boer, S. Unnikrishnan, M. C. Louwerse, and M. C. Elwenspoek, “Black silicon method: X. A review on high speed and selective plasma etching of silicon with profile control: an in-depth comparison between Bosch and cryostat DRIE

- processes as a roadmap to next generation equipment,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 19, no. 3, p. 33001, Mar. 2009.
- [193] J. Pereira *et al.*, “In situ x-ray photoelectron spectroscopy analysis of SiO<sub>x</sub>F<sub>y</sub> passivation layer obtained in a SF<sub>6</sub>/O<sub>2</sub> cryoetching process,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, no. 7, Feb. 2009.
- [194] M. Moreno, D. Daineka, and P. Roca i Cabarrocas, “Plasma texturing for silicon solar cells: From pyramids to inverted pyramids-like structures,” *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 94, no. 5, pp. 733–737, May 2010.
- [195] E. S. Ereifej, S. Khan, G. Newaz, J. Zhang, G. W. Auner, and P. J. Vandevord, “Characterization of astrocyte reactivity and gene expression on biomaterials for neural electrodes,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 99 A, no. 1, pp. 141–150, 2011.
- [196] L. Tang and J. W. Eaton, “Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions,” *Mol. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 351–8, Jun. 1999.
- [197] B. Kasemo and J. Gold, “Implant Surfaces and Interface Processes,” *Adv. Dent. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 8–20, Jun. 1999.
- [198] † Frédéric A. Denis *et al.*, “Protein Adsorption on Model Surfaces with Controlled Nanotopography and Chemistry,” *Langmuir*, vol. 18, no. 3, pp. 819–828, 2002.
- [199] Y. Wang *et al.*, “Research of protein adsorption on the different surface topography of the zinc oxide,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 47, no. 2, pp. 245–252, Feb. 2015.
- [200] D. H. K. Nguyen *et al.*, “Adsorption of Human Plasma Albumin and Fibronectin onto Nanostructured Black Silicon Surfaces,” *Langmuir*, vol. 32, no. 41, pp. 10744–10751, Oct. 2016.
- [201] C. E. Linsmeier, J. Thelin, and N. Danielsen, “Can histology solve the riddle of the nonfunctioning electrode?. Factors influencing the biocompatibility of brain machine interfaces,” *Prog. Brain Res.*, vol. 194, pp. 181–189, 2011.

## Függelék

### Nanostrukturált minták létrehozásának technológiai sora



**F1. ábra** A nanostrukturák morfológiájának technológiai paramétereiktől való függésének vizsgálatához készült nanostrukturált minták technológiai sorának sematikus ábrája. A technológiai lépések leírása a 3.1.1. fejezetben olvasható.

### *In vitro* mérésekhez használt minták gyártásának technológiai sora

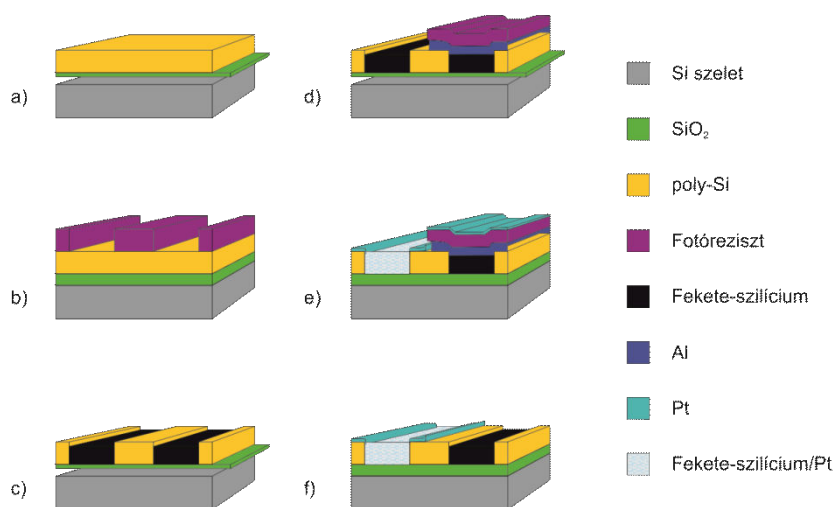
4'' (100) orientációjú 380µm vastag, egy oldalon polírozott Si szelet felületére 500µm vastag SiO<sub>2</sub> került termális oxidációval. Ezt követte az 1000µm vastag poliSi réteg alacsony nyomású kémiai gőzfázisú leválasztással (LPCVD) Tempress LPCVD berendezéssel SiH<sub>4</sub> gáz 250sccm áramoltatásával 630°C hőmérsékleten. A felület maszkolására S1818 fotorezisztet használtunk, és a marást megállító réteggént a SiO<sub>2</sub> réteg funkcionált. (A fotorezisztív lakk felrepedezését elkerülendő a mintázott rezisztet 40 percig 150°C-n égettük be.)

A nanostrukturák a 3.1.1. fejezetben ismertetett plazmamarási lépéssel kerültek kialakításra. A plazmamarási lépés előtt a jobb reprodukálhatóság érdekében a kamra kondicionálására került sor. A kamrába egy teszt szelet („dummy wafer”) került, melyen 10 perc SF<sub>6</sub>, majd 45 perc O<sub>2</sub> plazmamarást hajtottunk végre. Ezt követően az éles mintán alkalmazott marási recept 1 percig futott a megfelelő hőmérsékletre hűtött kamrában.

A platina réteg lift-ott technikával került a felületek megfelelő helyére. Ennek során 1,8 µm vastag Microposit S1818 reziszt került 500nm vastag porlasztott Al filmre. Fotolitográfiával kialakítottuk a felületen az Al/reziszt mintákat, melyek azokat a részeket fedik a szeleten, melyen nem kívánatos a platina réteg. Az Al/fotoreziszt rétegekre került a 15nm vastag TiO<sub>x</sub> mint tapadást segítő réteg fölé a 30nm vastag porlasztott platinaréteg. Ezt követően a reziszt réteg acetonban, majd az alumínium réteg foszforsavban történő marásával a porlasztott

TiO<sub>x</sub>/Pt réteg csak az alumíniummal nem fedett területeken maradt a szeleten. Utolsó lépésként a szeleteket a kívánt mintaméretre (4x4, illetve 7,1x7,1 mm) fűrészeltük.

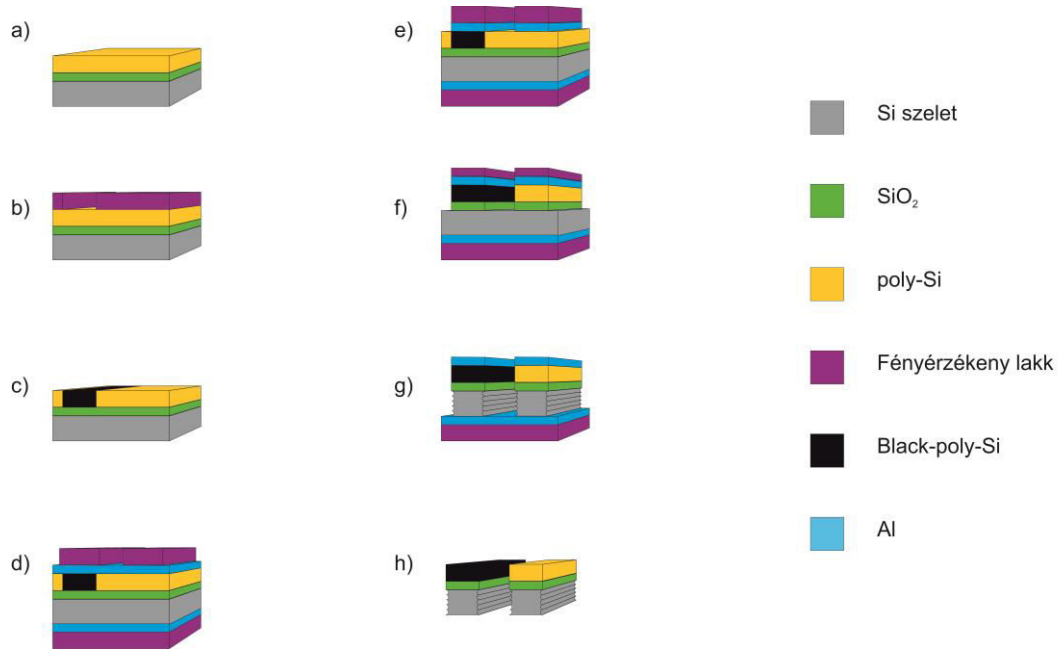
A gyártás lépéseit sematikusan az F2 ábra mutatja.



**F2. ábra** Az *in vitro* mérésekhez használt minták technológiai lépéseinek sematikus ábrája

### ***In vivo* mérésekhez használt minták gyártásának technológiai sora**

4'' (100) kristályorientációjú, 380 μm vastag egy oldalon polírozott szilícium szeletre 500nm SiO<sub>2</sub> került termális oxidációval. Ezt követte egy 1000nm vastag alacsony nyomású LPCVD-vel készült polikristályos szilícium réteg (Tempress, 250scm SiH<sub>4</sub>, 630°C). A nanostrukturálás Oxford Plasmalab 100 mély reaktív ionmaróban készült, Microposit 1818 fotoreziszt maszkoló réteg használatával. A lakkréteg stabilitása érdekében 40 percen át 150 fokon égettük be a lakkot a litográfias mintázatkialakítását követően. A nanostrukturák kialakítása előtt a kamra előkondicionálása a marási recept 10 perces futtatásával történt a -110°C hőmérsékletre hűtött kamrában. A nanostrukturált felületek kialakítását követően az eszközök kontúrmarása következett. A szelet mindkét oldalára 300nm Al réteg került a hátoldali rétegre ezen kívül 4,5μm vastag fotoreziszt réteget pörgettünk, így ez a rétegszerkezet szolgált a marást megállító réteggé. Az előoldalon a kimarásra szánt mintázatot, az implantátumok kontúrját fotolitográfiával, majd az alumínium réteg marásával valósítottuk meg. A polikristályos szilícium- szilícium-oxid réteg marása CHF<sub>3</sub> és Ar gázok keverékével történt, majd a szelet keresztülmarása Bosch folyamattal történt. Először 7 másodpercig SF<sub>6</sub> gáz, majd 5 mp C<sub>4</sub>F<sub>8</sub> gáz áramoltatásával. Előbbi lépésben valósul meg a szilícium fizikai marása, míg utóbbi az oldalfalak passziválásáért felelős. 500-600 ciklus szükséges a 380 μm szelet Al réteggel történő keresztülmarásához. A kontúrmarást a hátoldali Al és rezisztréteg eltávolítása követte, acetonban, majd négykomponensű Al maró oldatban. A lépések az F3. ábrán láthatóak.



**F3. ábra *In vivo* mérésekhez használt eszközök gyártási lépéseinek sematikus ábrája**