

Nanostrukturált felületek és idegszöveti sejtek kölcshatásának vizsgálata

PhD értekezés tézisei

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. Bevezetés

Az idegyszövetrel 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 [1], dystonia [2] vagy az esszenciális tremor [3], 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 alkotóelemeként, melyek segítségével tetraplég [4] vagy locked-in szindrómás betegek [5] 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. [6]. 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 mikrofabrikált elektródok működési élettartama erősen korlátozott az élő szövet védekező mechanizmusa miatt [7]–[9]. A beültetett eszköz körül hegszövet alakul ki, mely elektromos szigetelőként funkcionál az idegsejtek és az elektromos kontaktusok közt, ezzel rontva a jel/zaj viszonyt [10]. 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 [10]. A sérülés környezetében kialakuló szöveti védekező reakció ezért jelentősen megnehezíti az *in vivo* mérések helyes interpretációját [8], mivel idővel csökkent szenzitivitáshoz, stabilitáshoz, és gyakran végül az eszköz működésének ellehetetlenítéséhez vezet [11].

A sejtek a natív mikrokörnyezetükben az extracelluláris mátrix háromdimenziós nanoméretű struktúráival érintkeznek [12], és azok is befolyásolják működésüket [13]. 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 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 minták a sík felületűnél nagyobb fajlagos felületű kontaktálási felszín nyújthatnak, ezáltal alacsonyabb impedanciát és jobb jel/zaj viszont 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 neuroektrodermális összejtvonalt (NE-4C) idegi összejtjeit és az ezekből fejlődő idegszöveti sejteket, valamint egy immortalizált mikroglia sejt vonal (BV2) sejtjeit 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 sejt típus, 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 ismertetett 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. Módszerek

2.1. A nanostruktúrák gyártásának és vizsgálatának módszerei

- Egykristályos, illetve két féle hőmérsékleten (610 °C, 630°C) leválasztott polikristályos szilícium felületeken mély reaktív ionmarással az úgynevezett fekete szilícium módszerrel [14] alakítottunk ki nanostruktúrákat.
- A DRIE marás különféle paramétere mellett készültek minták. A változtatott paramétereket az 1. táblázat mutatja.

Minta elnevezése	poliSi leválasztási hőmérséklet	O ₂ térfogatáram [sccm]	Marási hőmérséklet [°C]	P _{RF} [W]	Mintatelítettség [%]
poliSi-A	630°C	10,15	-110, -100, -90	2,3	10,90
poliSi-B	610°C				
c-Si	-				

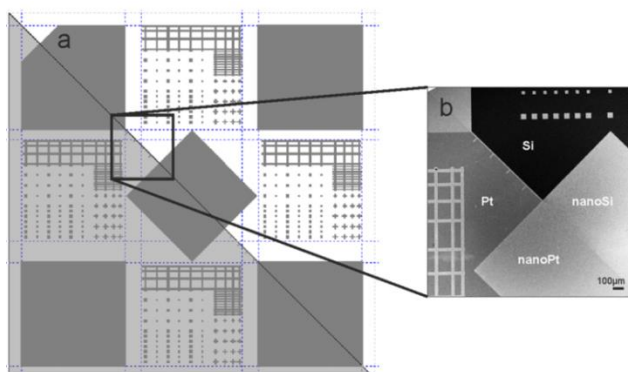
1. táblázat A munka során felhasznált nanostrukturált minták különféle marási paramétereinek összefoglalása. Az összes kísérletben állandóak voltak az alábbi paraméterek: SF₆ térfogatáram= 40sccm; Kamranyomás: 40mTorr; Marási idő=1 perc; P_{ICP}=700W

- Az elkészült felületek morfológiáját LEO XB1540 pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk és a felületeken két paramétert, az átlagos oszlopmagasságot, és az egységnyi területre eső oszlopsűrűséget mértük. Ezek változását a marási paraméterek változtatásának függvényében vizsgáltuk.

- A kialakított felületeket 15nm Ti és 100nm Pt bevonattal láttuk el, majd az így kialakított elektródokon három elektródos standard elektrokémiai cellában Ag/AgCl referencia és Pt ellenelektróddal ciklikus voltammetria (CV) és elektrokémiai impedancia-spektroszkópiás (EIS) méréseket végeztünk. Előbbiből a fajlagos felületnövekedést számítottuk [15], utóbbi segítségével az elektródok impedanciájának csökkenését határoztuk meg a síkfelületű Pt elektródhoz képest.
- A munkában szereplő minden minta gyártása és karakterizálása az MTA EK MFA Mikrotechnológia Osztályának MEMS laborjában zajlott. A felületek pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatában dr. Tóth Attila, dr. Illés Levente és Straszner András segítettek, az elektrokémiai mérésekben Horváth Ágoston vett részt.

2.2. *In vitro* idegi őssejtek és immortalizált mikroglia sejtek vizsgálati módszerei

- Az *in vitro* sejtenyészetekben történő mérésekhez két féle mintát terveztünk. Egyik típus felülete vagy egységesen nanostrukturált, vagy sima felületű szilícium vagy platina. A másik típusú minták felületén különféle mintázatokban helyezkedik el a négy féle felület valamelyike (1. ábra). A minták a MEMS technológia standard eljárásaival készültek, és a sejtek kiültetése előtt etanolban és hőlegsterilizátorban sterilizáltuk őket. Bioaktív bevonatot a mérésekben nem alkalmaztunk. Referenciaként szintén bevonat nélküli üveglemezt használtunk.



1. ábra *In vitro* tesztszekek felépítése

- A kialakított mintákon GFP NE-4C neuroektodermális őssejteket, valamint BV2 immortalizált eger mikroglia-sejteket tenyésztünk Minimal Essential Mediumban (Sigma Aldrich Corp, USA), 10% borjú szérum albuminnal (Gibco BRL Life Technologies UK) 4h illetve 24h tenyésztési idővel 37°C hőmérsékletű inkubátorban, 5% CO₂ atmoszférában. A tenyészeteken mikroszkópos illetve kvantitatív fotometriás méréseket végeztünk.
- A mikroszkópos vizsgálatokhoz a GFP NE-4C tenyészeteket a kijelölt időtartamot követően 4% w/v paraformaldehid tartalmú PBS-sel fixáltuk, majd Bisbenzimid tartalmú Mowiolal

tárgylemezre rögzítettük. A lemezek fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához Zeiss AxioVertA1-és berendezést használtunk Zeiss Zen Blue Edition szoftverrel és egy Zeiss Axiovert200M berendezést, AxioVision 4.8 szoftverrel (Jena, Németország) és AxioCam digitális kamerával. A felvételek alapján a sejtek különféle felületeken való viselkedéséről morfológiai jellemzőik alapján vontunk le következtetést.

- Egyes mintákat a tenyésztési időt követően MTT életképességi vizsgálatnak vetettük alá [16]. A mintához MTT-t (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2-5-dyphenil-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Corp. USA) adva a képződő formazán kristályokat 0,08N HCl – izopropilalkohol oldatban oldottuk fel, és a keletkező oldatot fényabszorpcióval vizsgáltuk Tecan F50 plate olvasóban (Männerdorf, Svájc) 570 nm mérő és 630 nm referencia megvilágítással.
- Egyes mintákon a túlélő sejtek számának kvantitatív összehasonlítását a sejtmagok fluorometriás mérésével vizsgáltuk. A tenyészetekben a sejtmagokat DAPI-val (4'-6-diamidino-2-phenilindole; Sigma-Aldrich) festettük, majd fluoreszcenciáját 360 nm-es gerjesztési hullámhosszal, 460 nm-en mértük egy TECAN SPARK 20 olvasóval.
- A GFP-NE-4C neuroektodermális őssejtek differenciálódását a felületeken alltrans-retinsavas (RA) indukció után 9 napos tenyésztési időt követően vizsgáltuk. Az indukált tenyészeteket szintén 4% w/v paraformaldehid tartalmú PBS-sel fixáltuk, majd a mintákat neuron specifikus III β -tubulinnal festettük anti-III- β tubulin (egér, IgG, Exbio, Prága) és Alexa Fluo594-hez kötött kecske-anti egér IgG másodlagos antitestek (Invitrogen, Thermo Fischer Sci Corp., USA) felhasználásával. A festett mintákat Bisbenzimid tartalmú Mowiolal tárgylemezhez rögzítettük, és a kialakult neuron nyúlványok elhelyezkedését és felület-preferenciáját kvalitatív módon, fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.
- 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.

2.3. *In vitro* primer asztrogliá sejtek vizsgálatának módszerei

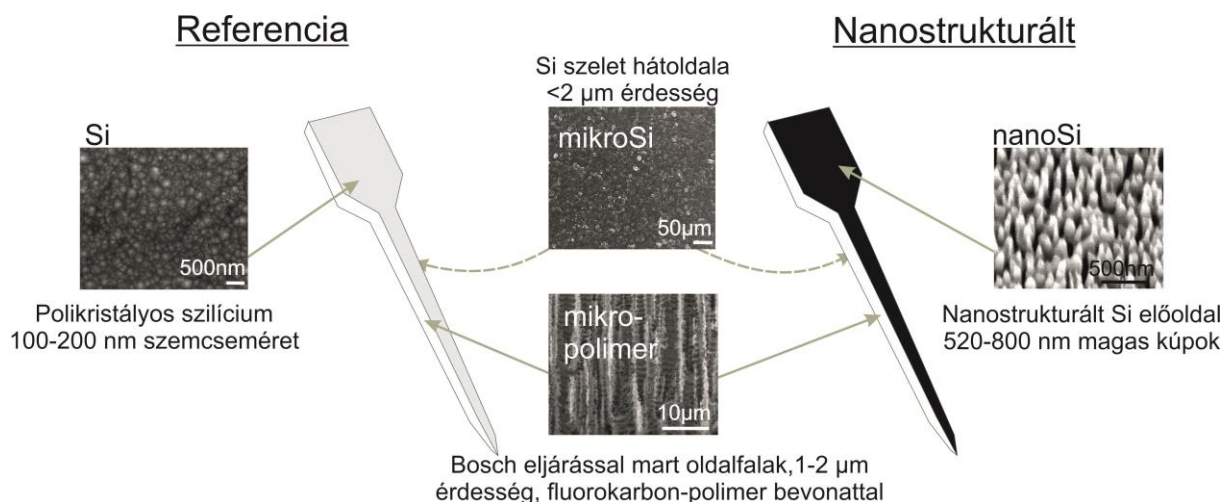
- CD1 vad típusú 0-4 napos egerek agyából izolált primer asztrogliá sejteket tenyésztettünk 24h illetve 48h tenyésztési idővel az 1. ábrán ismertetett mintákon, 10%FCS-t (Gibco) és 2mM glutamin-t (Sigma) tartalmazó HDMEM (Sigma) oldatban, 40 μ g/ml gentamicinnel (Hungharopharma, Budapest, Magyarország), és 2,5 μ g/ml amfotericin B-vel (Sigma), 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszféra mellett.
- A tenyésztési idő letelte után a sejteket 4% paraformaldehid (TAAB) tartalmú PBS-sel fixáltuk, majd immunhisztokémiai festéseket végeztünk rajtuk GFAP-ra (anti-GFAP ellenanyag; 1:1000; egér, monoklonális; Sigma, majd anti-egér-Alexa488; 1:500; Molecular

Probes), és aktin filamentumokra (Alexa546 konjugált falloidin;1:300; Molecular Probes). A sejtmagok festésére Mowiol 4.88-ban (Polysciences, Hamburg, Németország) oldott DAPI-t használtunk. A mintákat Zeiss Axio Observer Z1 mikroszkóppal, Zeiss Colibri white LED megvilágítási rendszer segítségével vizsgáltuk. A mikroszkópos felvételeket AxioCamMR3 kamerával készítettük.

- A mintákról 10x nagyítású mozaikfelvételeket készítettünk, melyek segítségével a különféle felületeken az egységnyi felületre jutó sejtszámokat határoztuk meg és hasonlítottuk össze.
- A mintákról készült 20x és 40x nagyítású fluoreszcens mikroszkópos felvételek alapján a sejtek viselkedésére és életképességére utaló morfológiai jegyeket vizsgáltunk kvalitatív módon.
- Egyes mintákat pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz készítettünk elő: a sejteket 2,5% glutáraldehid (Sigma) és 5% szacharóz tartalmú 0,1M kakodilát puffer oldatban fixáltuk, majd a tenyészeteket felszálló alkoholsorban dehidratáltuk (50%, 65%, 70%, 90%, 96%). Ezt követően szobahőmérsékleten amil-acetátot párologtattunk el a mintákról. A fixált minták felületére 20nm aranyréteget porlasztottunk, majd LEO XB1540 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk őket. A felvételeken a sejtfelszín morfológiáját, a sejtmagok alakját, és a sejtek különféle felületekhez való tapadási pontjait tanulmányoztuk.
- A primer asztrocita 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 sejtek izolálását, gondozását, fixálását Liliom Hanna végezte, a mikroszkópos vizsgálatokon Csernyus Bence dolgozott. A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok előkészítésében dr. Lőw Péter működött közre, a SEM felvételek az MTA EK MFA-ban készültek.

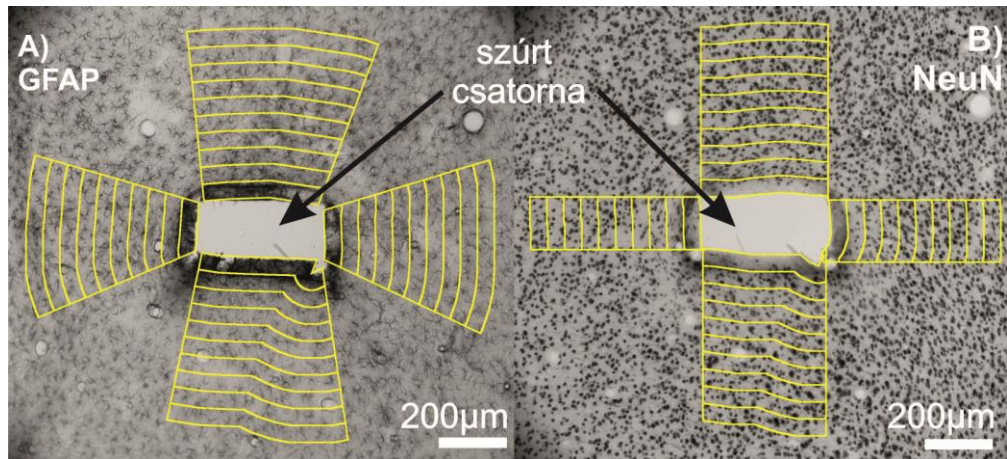
2.4. Nanostrukturák és élő agyszövet kölcsönhatásának vizsgálati módszerei

- Az *in vivo* vizsgálatokhoz tervezett két féle minta a 2. ábrán látható. Az eszközök a MEMS technológia standard lépéseivel készültek, a nanostrukturálás a 2.1. szakaszban ismertetett módszerrel, az eszköz kontúrmarása, mely a mikro-polimer felületet eredményezte, Bosch eljárással készült.



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

- Az *in vivo* méréseket 3 Wistar patkány agyszövetében végeztük, 6 nanostrukturált és 6 referencia eszközt implantáltunk, és a szöveteket 8 hét után vizsgáltuk. Az állatkísérletek az MTA Természettudományi Kutatóközpontjának Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézetében zajlottak. A perfúziót követően az agyszövetből Leica1200S Vibratome segítségével 60 μm vastag horizontális metszetek készültek, melyeken GFAP (GFAP-fehérje specifikus egér monoklonális antitest; GFAP, Millipore, clone GA5, 1:2000) és NeuN (NeuN, Millipore, clone A60, 1:2000) immunhisztokémiai festést végeztünk. A tárgylemezre rögzített metszetekről Zeiss Axio Scope A1 mikroszkóppal és egy Jai GO-5000M-PGE digitális kamerával fénymikroszkópos felvételeket készítettünk 10x-es nagyításban egy Zeiss EC Epiplan 10x/0,1HD objektívvel, 5 ms expozíciós idővel.
- A felvételeket általunk definiált mérési területekre osztottuk (3. ábra) Azemi és munkatársai munkája alapján [10]. A gliózis mértékét a GFAP-val festett metszeten az egyes ROI-kban mérhető átlagos pixelintenzitással határoztuk meg, és az implantátum helyétől való távolság függvényében ábrázoltuk. Az implantátum környezetében bekövetkező sejtpusztulás mértékének meghatározására a szűrt csatorna körül életben maradt, NeuN-nel festett neuronok egységnyi területre eső átlagos számát használtuk. Az értékeket mind a pixelintenzitás, mind a neuronszám esetében a szűrt sebtől 400-500μm távolságban található, referenciaként tekintett területek jellemzőihez normáltuk. Az eredményeket a teljes képkönyvtáron átlagoltunk távolság-intervallumonként. A statisztikai elemzést IBM SPSS Statistics 22 szoftverrel végeztük.



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

- 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, ezekben Kováts-Megyesi Bálint működött közre.

3. Új tudományos eredmények

3.1. A plazmamarással kialakuló nanostrukturák morfológiájának gyártási paraméter-függése

A fekete szilícium nanostrukturák 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 nanostrukturák kialakulásában számos technológiai tényező hatással van az elkészült felület morfológiájára. A nanostrukturált, platínával 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 nanostrukturák kialakításának technológiai paraméterei, az alapanyag kristály-orientációja, (melyet a polikristályos szilícium leválasztási hőmérséklete befolyásol), a DRIE marás során alkalmazott O₂ térfogatáram, a marási hőmérséklet, az RF teljesítmény, valamint a felület nanostrukturált mintával való lefedettsége 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?

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, O₂ 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/μm² 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/μm² és 71,7±14 db/μm² közt változik. A kiindulási polikristályos Si réteg leválasztási hőmérsékletétől jelentősen függ az O₂ térfogatáram változásának hatása a kialakuló nanostrukturák morfológiájára. A leválasztási hőmérséklet 610 °C -ról 630 °C -ra történő változásával a csökkenő O₂ 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 e paraméter változtatására.

I.b. 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.

3.2. *In vitro* neurális őssejtekkel és immortalizált mikroglia sejtekkel végzett mérések eredményei

In vitro modellben teszteltük olyan nanostrukturált és sima 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 a két sejtípusra nézve?
- A felületek anyagi minősége és topográfiája befolyásolja-e a sejtek tapadását és életképességét?
- Az idegi őssejtek képesek-e a vizsgált felületen neuronná differenciálódni?
- A vizsgált felületek hatással vannak-e a differenciálódásra és a differenciált tenyészetek viselkedésére?

TÉZISEK

II. Megmutattam, hogy a fekete-szilícium, és platínával 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 sejtípusok esetében. [II]

II.a. Beláttam, hogy a vizsgált felületek (*bioaktív bevonat nélküli polikristályos szilícium sík felszín és nanostrukturák: 70-110 darab oszlop/ μm^2 , 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 sejtípusra 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 platínával 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.

3.3. *In vitro* primer asztroglia sejtekkel végzett mérések eredményei

A mikrotechnológiai eljárásokkal készült és fekete szilícium nanostrukturákkal mintázott, részben platinával borított felületeken (1. ábra) primer asztroglia sejteket tenyésztünk 24h illetve 48h inkubációs idővel. 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?

TÉZISEK

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 sejtíváz-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 alaprétteg*) részesítik előnyben a nanostrukturálthoz (*70-110 darab oszlop/ μm^2 , átlagosan 600 nm magasság, random elhelyezkedés a felületen*) képest, utóbbiakra gyengén tapadnak, azokat igyekeznek elkerülni.

3.4. Nanostruktúrák és az agyszövet *in vivo* kölcsönhatásának vizsgálati eredményei

Az általunk vizsgált nanostrukturált szilícium tesztfelület élő szövetre való hatását patkány agykérgébe, 8 hetes krónikus beültetés után vizsgáltuk. A nanostrukturált szilícium felületet sík, illetve mikron méretű szemcsés szilícium felülettel, valamint mikroméretű mintákkal rendelkező, fluorokarbon-polimerrel bevont felületekkel hasonlítottuk össze. Számszerűsítettük a kialakuló gliózis súlyosságát a szövet GFAP festésével, majd kvantitatív képelemzéssel, valamint az implantátum különféle felületei közelében túlélő sejtek számát a szövet NeuN festésével, és a sejtek számolásával az implantátum helyétől 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?

TÉZISEK

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 kémiaiától a négy vizsgált felületet (*nanosstrukturált polikristályos szilícium: 70-110 darab oszlop/ μm^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.

4. Hasznosíthatóság

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 hegszövet 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.

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.

5. Publikációs jegyzék

5.1. 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. (2015)

[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)

5.2. Egyéb publikációk

5.2.1. Folyóiratcikkek

A Pongrácz, Z Fekete, G Márton, Zs Bérces, I Ulbert, P Fürjes, 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)

5.2.2. 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)

5.2.3. 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)

6. Irodalomjegyzék

- [1] M. J. Farrer, “Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, no. 4, pp. 306–318, Apr. 2006.
- [2] L. Vercueil *et al.*, “Deep brain stimulation in the treatment of severe dystonia,” *J. Neurol.*, vol. 248, no. 8, pp. 695–700, Aug. 2001.
- [3] J. Jankovic, “Essential Tremor: A Heterogenous Disorder.”
- [4] L. R. Hochberg *et al.*, “Reach and grasp by people with tetraplegia using a neurally controlled robotic arm,” *Nature*, vol. 485, no. 7398, pp. 372–375, May 2012.
- [5] A. Kübler, B. Kotchoubey, J. Kaiser, J. R. Wolpaw, and N. Birbaumer, “Brain-computer communication: unlocking the locked in,” *Psychol. Bull.*, vol. 127, no. 3, pp. 358–375, 2001.
- [6] J. P. Donoghue, “Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces,” *Nat. Neurosci.*, vol. 5 Suppl, no. Suppl, pp. 1085–8, Nov. 2002.
- [7] C. A. Chestek *et al.*, “Long-term stability of neural prosthetic control signals from silicon cortical arrays in rhesus macaque motor cortex,” *J. Neural Eng.*, vol. 8, no. 4, p. 45005, Aug. 2011.
- [8] 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.
- [9] N. F. Nolta, M. B. Christensen, P. D. Crane, J. L. Skousen, and P. A. Tresco, “BBB leakage, astrogliosis, and tissue loss correlate with silicon microelectrode array recording performance,” *Biomaterials*, vol. 53, pp. 753–762, 2015.
- [10] 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.
- [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] 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.
- [13] 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.

- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.