ÓBUDAI EGYETEM
ÓBUDA UNIVERSITY

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Bató Lilia

Integrált mikrofluidikai rendszerek sejtanalitikai célokra

Témavezető:
Dr. Fürjes Péter

ANYAGTUDOMÁNYOK ÉS TECHNOLÓGIÁK
DOKTORI ISKOLA

Budapest,
2026. június 12.

Komplex vizsga bizottsága:

Elnök: Horváth Zsolt József prof. emeritus, ÓE KVK
Tag: Takács Erzsébet DSc, ELKH EK EKI
Tag: Telegdi Lászlóné DSc prof. emerita, ÓE RKK

Nyilvános védés teljes bizottsága:

Elnök: Réger Mihály DSc egyetemi tanár, ÓE BGK
Opponens: Bonyár Attila DSc egyetemi tanár, BME EET
Opponens: Iván Kristóf PhD egyetemi docens, PPKE
Titkár: Varga Bálint PhD egyetemi docens, ÓE BGK
Tag: Nemcsics Ákos DSc egyetemi tanár, ÓE KVK
Tag: Galajda Péter PhD tud. főmunkatárs, HUN-REN SZBK
Tag: Horváth Zsolt József DSc prof. emeritus, ÓEK

Nyilvános védés időpontja:

NYILATKOZAT A MUNKA ÖNÁLLÓSÁGÁRÓL, IRODALMI FORRÁSOK MEGFELELŐ MÓDON TÖRTÉNT IDÉZÉSÉRŐL

Alulírott Bató Lilia kijelentem, hogy az

Integrált mikrofluidikai rendszerek sejtanalitikai célokra

című benyújtott doktori értekezést magam készítettem, és abban csak az irodalmi hivatkozások listáján megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, amelyet szó szerint, vagy azonos tartalomban, de átfogalmazva más forrásból átvettem, a forrás megadásával egyértelműen megjelöltem.

Budapest, 2026. június 12.

.....

(aláírás)

Tartalomjegyzék

1. Kivonat **1**

2. Abstract **2**

3. Bevezetés **3**

4. Irodalmi áttekintés **5**

4.1. Mikrofluidikai alapok 5
4.2. A Lab-on-a-Chip eszközöktől az Organ-on-Chip rendszerekig 7
4.3. Kémiai gradiens kialakítása 10
4.3.1. Diffúzió általános tárgyalása 10
4.3.2. Einstein-törvény 11
4.3.3. Kémiai gradiens kialakítása mikrofluidikai chipekben 11
4.4. Diffúzió mikrofluidikában 13
4.4.1. Fehérjék diffúziós állandóinak meghatározása 14
4.5. Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia – EIS 15
4.5.1. Az impedancia meghatározó tényezői elektrolitokban 16
4.5.2. Impedancia mérés során alkalmazott elektróda konfigurációk . . . 17
4.6. Sejtanalitika impedancia spektroszkópiával 18
4.6.1. Sejtmodellek 18
4.6.2. Ekvivalens áramköri modellek 19
4.6.3. Karakterisztikus tartományok 21
4.6.4. Az EIS alkalmazásai mikrofluidikai rendszerekben 22
4.7. Impedancia spektroszkópia, mint sejtanalitikai módszer 24
4.7.1. Transzepithelialis/Transzendoteliális Elektromos Ellenállás 24
4.7.2. Elektromos Sejt-Szubsztrát Impedancia Érzékelés 25
4.7.3. Impedancia tomográfia 26
4.8. Sejtcsapdázási módszerek 28
4.8.1. Hidrodinamikai csapdázás 29
4.8.2. Dielektroforézis 30
4.8.3. Akusztoforézis 31
4.8.4. Magnetoforézis 32
4.8.5. Optikai csipesz 33

5. Célkitűzés **35**

6. Technológiai ismertető **37**
6.1. Gyártástechnológia . . . 37
6.1.1. Mikrofluidikai struktúrák jellemző anyaga . . . 37
6.1.2. Mikrofluidikai struktúrák kialakítása lágy litográfiával . . . 38
6.2. Vékonyrétegek előállítása . . . 40
6.2.1. Vákuumporlasztás . . . 40
6.2.2. Vákuumpárologtatás . . . 40
6.3. Lift-off litográfia . . . 41
6.4. Anyagvizsgálati és nanomegmunkálási módszerek . . . 42
6.4.1. Pásztázó elektronmikroszkóp . . . 42
6.4.2. Fókuszált ionsugaras marás . . . 43

7. Kísérleti anyagok és módszerek **44**
7.1. Lágy litográfia . . . 44
7.2. Elektródákkal integrált mikrofluidika . . . 44
7.3. Elektromos mérések kivitelezése . . . 45
7.4. Mikrobiális tenyésztés . . . 46
7.4.1. Élesztősejtek . . . 46
7.4.2. Humán rákos sejtek . . . 47

8. Eredmények **48**
8.1. Kémiai gradiens kialakításának vizsgálata . . . 48
8.1.1. Képalkotás . . . 49
8.1.2. Feltöltési módszer vizsgálata . . . 50
8.1.3. Fehérjék diffúziós állandóinak meghatározása . . . 51
8.2. Elektródák integrálása mikrofluidikai rendszerekbe . . . 56
8.2.1. Képalkotás . . . 56
8.2.2. Anyagvizsgálati és megmunkálási módszerek . . . 57
8.2.3. CELLAN - PDMS mikrofluidikai rendszer integrált elektródákkal 57
8.2.3.1. A mikrofluidikai rendszer feltöltése . . . 59
8.2.3.2. Funkcionális validáció . . . 60
8.2.3.3. Reprodukálhatósági vizsgálatok . . . 61
8.2.3.4. Sejtcsapdázási vizsgálatok . . . 62
8.2.4. CELLAN 4EL - mikrofluidika SU-8-ban, négy integrált elektródával 66
8.2.4.1. A mikrofludikai rendszer feltöltése . . . 69
8.2.4.2. Elektródák anyagának vizsgálata . . . 69
8.2.4.3. Elektróda geometria és elhelyezkedés hatásai a mérésekre 71
8.2.4.4. Az elektródák távolságának vizsgálata . . . 72
8.2.4.5. Viabilitási vizsgálatok élesztősejteken . . . 75

8.2.4.6. Viabilitási vizsgálatok humán sejteken 77

9. Egyéb fejlesztési irányok **80**
9.1. Elektromos Impedancia Tomográfia 80
9.1.1. Biokompatibilitás vizsgálata 81
9.1.1.1. Két- és négyelektródás mérési módszerek összehasonlítása 82
9.1.1.2. Mikrogyöngyök lineáris leképezése 83

10. Összefoglalás **87**

11. Új tudományos eredmények - Tézisek **89**

12. Köszönetnyilvánítás **91**

13. Saját publikációk **92**
13.1. Doktori értekezés alapjául szolgáló publikációk 92
13.1.1. Konferencia részvételek 92
13.2. Egyéb publikációk 93

14. Hivatkozások **94**

15. Függelék **107**
15.1. Linearitás vizsgálata 107
15.2. Python programkód a diffúziós mérések kiértékeléséhez 108
15.3. Érzékenységvizsgálat a diffúziós profilok illesztési paramétereire 108
15.4. Ekvivalens áramköri illesztéses - CELLAN 109
15.5. További mérések - CELLAN 4EL 109

Jelölések és rövidítések jegyzéke

BioMEMS	Bio-Mikroelektromechanikai rendszerek
BSA	Szarvasmarha-szérumalbumin
CPE	Konstans fázis elem
Cy3	Cianin-3
DAPI	4,6-diamidino-2-fenil-indol
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium
ECIS	Elektromos Sejt-szubsztrát Impedancia Érzékelés
EDS	Energiadiszperzív Röntgenspektroszkópia
eGFP	fokozott Zöld Fluoreszcens Protein
EIS	Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia
EIT	Elektromos Impedancia Tomográfia
FIB	Fókuszált Ionsugaras Marás
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
GFP	Zöld Fluoreszcens Protein
HepG2	Humán Hepatocelluláris Karcinóma sejtvonal
IgG	Immunglobulin G
LoC	Lab-on-a-Chip
mCherry	monomer Vörös Fluoreszcens Fehérje
MEMS	Mikroelektromechanikai rendszerek
MES-SA	Humán Uterus Leiomyosarcoma sejtvonal
mOrange	monomer Narancssárga Fluoreszcens Fehérje
MPS	Mikrofiziológiai rendszerek
NYÁK	Nyomtatott huzalozású lemez
OoC	Organ-on-a-Chip
PBS	Foszfátpufferes sóoldat
PDMS	Polidimetil-Sziloxán
PEO	Polietilén-oxid
PoC	Point-of-Care / Személyreszabott gyógyászat
Rh B	Rhodamin B
SEM	Pásztázó Elektronmikroszkóp
TEER	Transzepitheliális/Transzendoteliális Elektromos Ellenállás
YPD	Élesztő–pepton–dextróz táptalaj

1. Kivonat

A mikrofluidikai eszközök elterjedésével és rohamos fejlődésével lehetőség nyílt olyan betegágy mellett alkalmazható (Point-of-Care, PoC) eszközök létrehozására, melyek gyors, egyszerű, mégis megbízható alkalmazása révén képesek lehetnek perceken belül releváns eredményeket adni, így biológiai, kémiai, orvosdiagnosztikai és gyógyszervegyészeti szempontból is rendkívül perspektivikusak. A Lab-on-chip (LoC) eszközök olyan miniatürizált bioérzékelő rendszerek, melyek integráltan képesek akár komplex laboratóriumi preparációs lépéseket és mérési feladatokat is kompakt formában elvégezni.

A LoC rendszerek továbbfejlesztéseként alakultak ki a mikrofiziológiai (MPS) és az Organ-on-a-chip (OoC) rendszerek. Ezek mesterséges, akár emberi szövetek, szervek kialakítására, fenntartására és összekapcsolására alkalmasak kontrollált kémiai környezetben. Az OoC eszközök segíthetnek felderíteni a különböző sejtek és szervek közötti komplex interakciókat, illetve követni a környezeti hatásokra adott válaszfolyamatokat. Ennek megfelelően fő céljuk a gyógyszerhatóanyagok tesztelése és a betegségmechanizmusok vizsgálata. Alkalmazásuk elősegíti az állatkísérletek számának csökkentését, hosszú távon pedig azok kiváltását, hiszen lehetővé teszik a sejtek és szövetek alkalmazását a pre-klinikai vizsgálati szakaszban. Gyógyszerhatóanyagok tesztelése esetén pontosabb eredményeket adhatnak az állatokon végzett kísérleteknél, mivel az állatok és az ember metabolizmusa eltérhet. Az OoC rendszerek a rákkutatás fejlődését is elősegíthetik, hiszen alkalmasak lehetnek az érintett szövetekben zajló folyamatok hatóanyagokra adott reakciójának vizsgálatára. Ennek megfelelően a személyre szabott gyógyászat elterjedésében is meghatározó szerepet tölthetnek be.

Kutatómunkám során egy olyan integrált mikrofluidikai cella tervezésével és vizsgálatával foglalkoztam, mely képes sejtpopulációk vagy egyedi sejtek csapdázására, kontrollált kémiai környezet létrehozására, valamint hatóanyagok injektálására és azok hatásainak in vitro követésére, mind optikai, mind elektromos módszerekkel. Kutatásom során olyan applikáció-specifikus eszközt fejlesztettem, mely integrált mikrofluidikai és érzékelő rendszerek segítségével egyszerre biztosítja a sejtpopulációk fenntartását, kémiai hatóanyagokkal való kezelését, valamint élettani viselkedésük valós idejű monitorozását. Az optikai méréseket fluoreszcens mikroszkópiával, az elektromos vizsgálatokat impedancia spektroszkópia alkalmazásával végeztem, mely non-invazív és valós idejű méréseket tesz lehetővé.

Jelen kutatás eredményei eszközt kínálhatnak a sejtek válaszainak folyamatos követésére, előrevetítve a baktériumok antibiotikum-rezisztenciájának vizsgálati lehetőségét, illetve humán sejtek vizsgálatát, melynek célja a rákos sejtek valós idejű monitorozása és a kemoterápiás hatóanyagokra adott válaszok nyomon követése.

2. Abstract

With the rapid rise, spread, and development of microfluidic devices, there is an opportunity to create Point-of-Care (PoC) devices that offer fast and simple, yet reliable applications, promising to provide relevant measurement results within minutes. These devices are extremely promising not only from a biological and chemical point of view but also for medical diagnostics and pharmaceutical research. Lab-on-a-Chip (LoC) devices are miniaturized biosensing systems that are capable of integrating complex laboratory preparation steps and performing measurements in a compact environment. Their main purpose lies in testing drug compounds and developing disease mechanisms that can realise personalised medicine, which also proposes the effective application of PoC devices.

Organ-on-a-Chip (OoC) technologies have emerged as a further development of LoC systems, which are suitable for the creation, maintenance, and interconnection of artificial and even human, tissues and organs within a controlled chemical environment. OoC devices can help explore the interactions between different cells and organs, track complex biological responses, and study their reactions to environmental factors. Their application promotes the reduction and, in the long term, the replacement of animal testing by allowing the use of artificial cells and tissues during the preclinical phase. When testing pharmaceutical compounds, OoC systems can provide more accurate results than animal experiments, as animal and human metabolism may differ. These systems can also contribute significantly to cancer research by enabling the study of how affected tissues and their internal processes respond to active agents. Accordingly, OoC platforms may play a key role in the development and spread of personalised medicine.

During my research, I designed and investigated a microfluidic cell capable of trapping cell populations or individual cells, establishing a controlled chemical environment, injecting active compounds, and monitoring their effects in vitro using both optical and electrical methods. I developed an application-specific device that, through integrated microfluidic and sensing systems, simultaneously ensures the maintenance of cell populations, their treatment with chemical agents, and real-time monitoring of their physiological behaviour. Optical measurements were performed using fluorescence microscopy, while electrical investigations were carried out via electrochemical impedance spectroscopy, which enables non-invasive and real-time measurements.

The results of this research may provide a solution for the continuous monitoring of cellular responses, opening the way for the investigation of bacterial antibiotic resistance, as well as studies on human cells, with the particular aim of real-time monitoring of cancer cells and tracking their responses to chemotherapeutic agents.

3. Bevezetés

Különböző sejtek és sejtpopulációk vizsgálata olyan mesterséges rendszerben, mely valóságos környezetüket a lehető legpontosabban modellezi, orvosbiológiai szempontból rendkívül előnyös. Erre a célra bevett módszer a különféle, valósághű kémiai környezet kialakítására alkalmas mikrofluidikai rendszerek alkalmazása, hiszen ezek a rendszerek mikrométeres skálán alkalmasak kis mennyiségű folyadékok szállítására, irányítására és célzott folyadékműveletek végrehajtására. Legfőbb előnyüket a chipek kis mérete, komplexitása és funkcionális integrálhatósága adja. Ezenfelül hordozhatóak, kis mintaigényűek, így a felhasznált hatóanyagok mennyisége csökken, mely a célzott eljárás költségét csökkenti és gyorsabb eredményekhez vezet. További előnyük, hogy ezen a méretskálán megjelenő egyedi fizikai jelenségek előnyöket biztosítanak a különböző felhasználások során[1].

A mikrofluidikai rendszerek és különböző alkalmazásaik számos területen megjelennek, így biológiai, kémiai, orvosdiagnosztikai és gyógyszervegyészeti szempontból is rendkívül perspektivikusak[2]. Az egyik legfontosabb feladatuk az úgynevezett Lab-on-a-Chip (LoC) rendszerekben a mintapreparációs funkciók megoldása. A LoC eszközök olyan komplex érzékelő rendszerek, melyek integráltan képesek akár laboratóriumi preparációs lépéseket, akár mérési feladatokat egyaránt elvégezni. Ennek megfelelően a mikrofluidikai rendszerek vizsgálata és fejlesztése sokoldalú felhasználásuknak köszönhetően az elmúlt évtizedben népszerű kutatási témává vált[3].

A LoC rendszerek sejtes alkalmazásra történő továbbfejlesztésével létrejöttek a mikrofizológia (MPS) és Organ-on-Chip (OoC) rendszerek, melyek különböző sejtek, vagy akár emberi szövetek beható vizsgálatára fókuszálnak. A különféle szövetek összekapcsolása segíthet megérteni a sejtek és szervek közötti komplex kölcsönhatásokat, illetve követni a környezeti hatásokra adott válaszfolyamatokat[4]. Segítségükkel felgyorsítható a gyógyszerek tesztelése és fejlesztése, hiszen a hatóanyagok célzott bejuttatása és hatásuk nyomon követése a vizsgált biológiai modell-rendszerben kontrollált módon megvalósítható. Ezek a rendszerek jelenthetik a megoldást az állatkísérletek számának csökkentésére és hosszú távú megszüntetésére, mivel lehetővé teszik a mesterséges környezetben fenntartott sejtek és szövetek alkalmazását a pre-klinikai vizsgálatok során. Ezáltal a gyógyszerhatóanyagok tesztelésénél pontosabb eredményeket nyújthat az állatkísérleteknél, mivel az állatok és az ember metabolizmusa eltérhet. Az Organ-on-Chip rendszerek a rákkutatás fejlődését is elősegíthetik, hiszen alkalmasak lehetnek az érintett szövetek, a bennük zajló folyamatok[5], hatóanyagokra való reagálásuk[6], illetve tumorsejtek egészséges sejtekkel való kölcsönhatásának vizsgálatára[7] és elválasztására is[8]. Ennek megfelelően az OoC rendszerek a személyre szabott gyógyászat elterjedésében is meghatározó szerepet játszhatnak.

Kutatásom során elsődleges célom olyan mikrofluidikai struktúrák megtervezése, létrehozása és vizsgálata volt, melyek alkalmasak kontrollált kémiai környezet kialakítására, sejtek csapdázására és tulajdonságaik nyomon követésére. Ezek nemcsak a sejtanalitikai feladatok megvalósítását segítik, hanem elektródák integrálásával lehetőséget nyújtanak non-invazív és jelölésmentes mérési technikák alkalmazására, így a csapdázott sejtek tulajdonságai zavartalanul vizsgálhatóak. A mikroszkopikus mérettartományban kialakított kémiai gradiens segítségével a struktúra képes hatóanyagok szabályozott koncentrációban történő bejuttatására. A rendszer lehetővé teszi a benne csapdázott sejtek optikai vizsgálatát, valamint fluoreszcens festéssel a sejtek különböző hatóanyagokra adott válaszainak tanulmányozását. A sejtek életképességének és szaporodásának nyomon követése fontos lépés egy olyan eszköz kifejlesztésében, mely hosszú távon hozzájárulhat a rákkutatáshoz, illetve új utakat nyithat a baktériumok antibiotikum-rezisztenciájának gyors vizsgálatában.

Munkám során a mikrofluidikai chipek, illetve elektródák előállítását és a rajtuk folytatott méréseket a HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetének Mikrorendszerek Laboratóriumában végeztem.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Mikrofluidikai alapok

A mikrofluidika kis mennyiségű, alacsony térfogatú és karakterisztikus méretű rendszerekkel foglalkozik, melyekben a folyadékok precíz mozgatása, valamint komplex folyadékmechanikai és kémiai folyamatok megvalósítása a cél. A mikrofluidikai csatornák jellemző mérettartománya 1 µm – 100 µm, melyekben lehetséges a tipikusan 100 nl – 10 µl térfogatú folyadékok áramlásának vizsgálata. A csatornákban áramló folyadék mennyisége tipikusan a µl/perc tartományba esik. A chipekben kialakított csatornák mikrométeres karakterisztikus mérete miatt a makroszkopikus jelenségekhez képest merőben mást tapasztalunk. Az egyik legfőbb különbség az áramlás típusában rejlik, ami a Reynolds-szám segítségével határozható meg, mely megmutatja, hogy a folyadékra ható erők közül a viszkózus, avagy a tehetetlenségi erők dominálnak az adott rendszerben. A Reynolds-szám a következőképpen számolható:

$$Re = \frac{\rho v l}{\eta}, \tag{1}$$

ahol ρ a közeg sűrűsége, v az áramlás sebessége, l a rendszer karakterisztikus hossza, η pedig a dinamikai viszkozitás. Kis Reynolds-számok ($Re < 2000$) esetén a viszkózus erők a meghatározóak, így az áramlás lamináris, míg nagy Re esetén turbulens áramlásról beszélhetünk. A mikrofluidikai rendszerek alacsony karakterisztikus méretei miatt ($Re \approx 1 - 100$) a folyadékáramlás laminárissá válik. Lamináris áramlás esetén a folyadékoszlopok elmozdulása párhuzamos egymással, így a folyadékon belüli keveredés nehézkes, leginkább csak a diffúzió segítségével valósulhat meg. Ennek feloldására a keveredést a mikrochipekbe épített komplex keverő szerkezetek segíthetik elő.

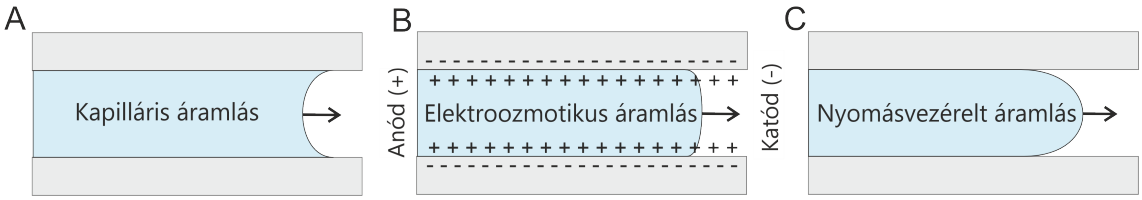
Az áramlás létrehozásának és a folyadékok mozgatásának többféle módja létezik a chipeken belül, például autonóm módon vagy pumpák segítségével (1. ábra). A kapilláris áramlás során a folyadék és a csatorna fala közötti kapilláris erő, illetve a folyadék felületi feszültsége miatt áramlás indul meg a csatornában, melyet nagymértékben befolyásol a csatorna anyaga. Vizes oldatok esetén a kapilláris áramlás kialakulásához hidrofil csatornafal szükséges. Így ajánlatos az eredendően hidrofób csatorna felületi tulajdonságainak módosítása, például oxigénplazmás kezeléssel vagy kémiai felületmódosítással. A csatorna hidrofil és hidrofób részeinek arányával, a csatornafalak felületi tulajdonságaival és a kapillárisok méretének megfelelő beállításával az áramlás sebessége szabályozható[9].

Elektroozmotikus áramlás során a csatorna falainak elektromos polarizációjával legömbölyített profilú áramlás jön létre a csatornában. Az áramlást nagymértékben befolyásolhatja a csatorna falainak borítása és a csatornában található folyadék összetétele[10].

Az említett autonóm módszerek mellett pumpák alkalmazásával nyomásvezérelt áramlás hozható létre, mellyel lehetővé teszi a folyadék mozgásának precíz szabályozását a rendszeren belül. A Newtoni folyadékok lamináris áramlása esetén a csatorna keresztmetszetében kialakuló sebességprofil parabolikus jellegű. Ennek oka, hogy a falak mentén érvényesülő peremfeltétel miatt a sebesség minimális, míg a csatorna középvonala felé haladva maximális. Az áramlás jellemzőit a Hagen–Poiseuille-törvény írja le, mely a térfogatáram (ΔV) és a nyomáskülönbség (Δp) közötti összefüggést írja le:

$$\Delta V = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot l} \tag{2}$$

ahol r a csatorna sugara, l a cső hossza, η pedig a folyadék dinamikus viszkozitása. A pontos kontroll és a parabolikus áramlási profil miatt a nyomásvezérelt áramlás az elterjedtebb a módszerek közül[11].



1. ábra. Áramlás létrehozásának típusai a mikrocsatornákban: (A) Kapilláris, (B) elektroozmotikus és (C) nyomásvezérelt áramlási profilok[1]

4.2. A Lab-on-a-Chip eszközöktől az Organ-on-Chip rendszerekig

A LoC technológia kiemelkedő fontosságúvá vált az elmúlt években, hiszen kompakt kialakítása révén kiválthatja a költséges laboratóriumi technikákat, csökkentheti a minták és a hatóanyagok mennyiségét, így költséghatékonyan teszi lehetővé a szükséges minta nagy áteresztőképességű (high-throughput) elemzését. A LoC technológia számos tudományterületet összehangoltan alkalmaz, mint például a fluidika, az elektronika, az optika és a bioérzékelők. Célja a laboratóriumi funkciók ellátása egyetlen miniatürizált chipen belül, mint például a mintavétel, a minta-előkészítés, a kémiai reakciók, a termékek szétválasztása és elkülönítése és az érzékelés (2. ábra). A LoC rendszerek csökkentik a nagy méretű műszerekre és a kézi beavatkozásra való igényt, ezáltal növelik az automatizáltságot és az üzemi hatékonyságot. Kis méretük miatt hordozhatóak és eldobhatóak, csökkentik a mérési időt, így segítségükkel megvalósítható a betegágy melletti (Point-of-Care, PoC) diagnosztika[2].

Az in vitro sejtkultúrák vagy akár egyedi sejtek vizsgálatára tervezett mikrofiziológiai rendszerek jelentős előrelépést jelentenek a gyógyszerkutatás, a szűrés és a terápiás alkalmazások fejlesztése terén[12–14]. Az alkalmazásorientált, mikrofluidikai és érzékelő rendszereket integráló eszközök képesek sejtkultúrák és szövetek mesterséges fenntartására, valamint különböző kémiai hatóanyagokkal való kezelésükre és viselkedésük valós idejű monitorozására[15]. Ez a multifunkcionális működés elengedhetetlen a személyre szabott orvoslásban és a gyógyszerfejlesztésben[16,17].

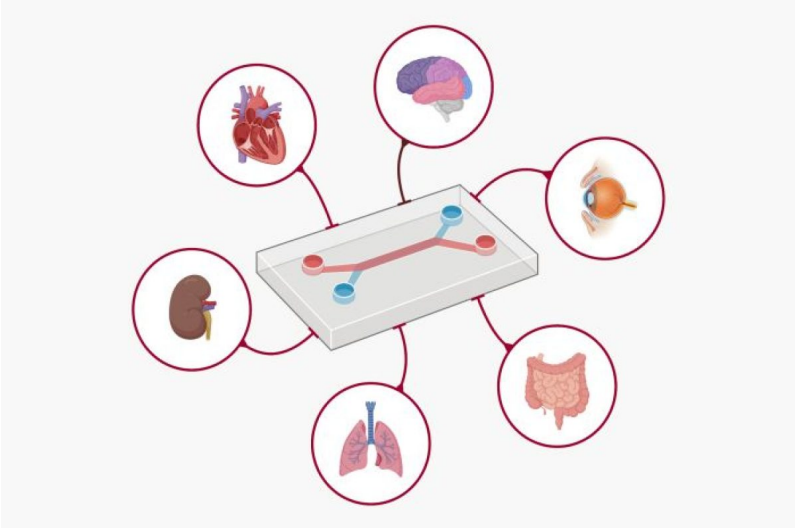


2. ábra. A Lab-on-a-Chip rendszerek tipikus példája, mely mutatja a laboratórium elemeinek egy chipen történő integrálását[18].

A technika eredete az 1970-es évekre tehető, amikor Terry és kutatócsoportja szilícium szeleten megvalósított egy miniatürizált gázkromatográfiás analizátort[19]. Manz és munkatársai 1990-es munkáját követően a miniatürizált teljes kémiai analízisrendszerek (μTAS) koncepciója jelentős elismerésre tett szert[20]. Az áttörést Harrison és Manz 1993-as felfedezése hozta, amikor bemutatták az on-chip kapilláris elektroforézist[21]. Az elmúlt évtizedek során a LoC technológia intenzív fejlődésen ment keresztül, főként a biotechnológiai alkalmazási irányában, a biológiai és elméleti modellektől kezdve a proof-of-concept kutatásokon át egészen a kereskedelmi alkalmazásokig. A lágy litográfia 1998-as bemutatását követően a LoC területén újabb előrelépés történt a PDMS alkalmazásának köszönhetően, mely laboratóriumi szinten biztosította a létrehozott mikroméretű rendszerek megbízható, gyors és reprodukálható előállítását és az optikai átlátszóságot[22].

A LoC rendszerek korai alkalmazásai közé tartozik a DNS analízis, a fehérjék szeparációja és a sejtválogatás, napjainkra pedig a mikrofiziológiai és Organ-on-Chip rendszerek megjelenésével a személyre szabott gyógyászat, a valós idejű nyomon követés és a gyógyszerhatóanyag tesztelés került előtérbe[23]. A technika mesterséges intelligenciával (AI) való kombinálásával növelhető a diagnosztikai eljárások pontossága és megbízhatósága, valamint a betegségek és a kezelésre adott válaszreakciók előrejelzése[24].

Az elmúlt években az OoC technológiák a személyre szabott orvoslás új paradigmájaként jelentek meg. Az OoC eszközök alapvető célja a különböző sejtek és szövetek közötti kölcsönhatások vizsgálata a komplexebb sejtkultúrák, vagy akár szövetek tenyésztésére és fenntartására alkalmas mikrofluidikai rendszerekben (3. ábra).



3. ábra. Az Organ-on-Chip rendszerek sematikus ábrája szemlélteti a különböző sejtek és szövetek egy chipen történő vizsgálatának lehetőségét.[1]

[1] https://www.ufluidix.com/microfluidics-applications/organ-on-a-chip/ (Utoljára látogatva: 2026. június 12.)

Az OoC koncepciója először 2005-ben tűnt fel, amikor Huh és csapata létrehozott egy lung-on-a-chip rendszert, ahol tüdőszövetet vizsgáltak PDMS csatornák között elhelyezett porózus membránon, mely az emberi tüdőben található körülmények reprodukálására szolgált[25]. Azóta számos rendszer jelent meg, mely például a szív-, bél-, vese-, májszövetek vagy akár a vér-agy gát működését is képes vizsgálni[24,26]. Az említett rendszerek a gyógyszerfejlesztésben, a rákkutatásban és a betegségek modellezésében is igen jelentőssé váltak, különösen mióta az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) idén bejelentette, hogy fokozatosan megszünteti az állatkísérleteket a hatékonyabb, emberi rendszerekre épülő módszerek javára[13,27]. Ennek oka, hogy az állatmodelleken kapott eredmények humán viszonylatban értelmezve gyakran pontatlanok, mely sokszor hibás következtetésekre vezet a fajok közötti komplexitás- és anyagcserebeli különbségek miatt[28].

Az OoC rendszerekben alkalmazott modellek, illetve a sejtek és szövetek belső szerkezetének és működésének alaposabb megértése különféle szenzorok fejlesztését és integrálását ösztönözte[16,29,30]. Az érzékelőkből származó adatok akár mesterséges intelligenciával és gépi tanulási módszerekkel is kombinálhatóak, így növelve a kísérleti folyamatok megbízhatóságát és hatékonyságát, mely által nagyobb mérési pontosság érhető el[31]. További előnyt jelent a 2D-s modellekkel szemben, hogy a szövetek 3D-s szerkezete is vizsgálhatóvá válik, mely a sejtek élő szervezetben található mikrokörnyezetének reprodukálását teszi lehetővé[12]. Habár az OoC rendszerek 3D sejttenyésztési módszere számos előnyt nyújt a 2D sejttenyészetekkel szemben, például javítja a gyógyszer-anyagcsere vizsgálhatóságát, viszont költséges, és a kísérletek nehezen értelmezhetőek és reprodukálhatóak[32]. Emiatt a 2D sejttenyésztési módszerek alkalmazása továbbra is releváns a hosszú távú kísérletekben, illetve a tervezett rendszerek előzetes tesztelése során.[33].

4.3. Kémiai gradiens kialakítása

4.3.1. Diffúzió általános tárgyalása

A diffúzió atomok és molekulák mozgásán alapuló anyagtranszport. Mechanizmusa gázokban és folyadékokban a Brown-mozgás, míg szilárd testekben az atomok néhány Å nagyságrendű, sztochasztikus mozgása, mely eredő anyagáramláshoz vezet. A diffúzió hajtóereje a rendszerben található koncentrációkülönbség kiegyenlítése, mely a magasabb koncentrációjú helytől az alacsonyabb felé halad, azaz a koncentrációgradiens ellenében történik. A diffúziót a Fick törvényekkel írhatjuk le, melyek segítségével meghatározható a diffúzió sebességét jellemző állandó, azaz a diffúziós állandó.

A diffúzió tárgyalásánál időtől és helytől függő koncentrációt teszünk fel. A részecskék száma a rendszeren belül nem változhat, így a kontinuitási törvény érvényes a koncentráció (c) változására:

$$\dot{c}(\vec{x},t) = -\vec{\nabla}\vec{j}(\vec{x},t), \tag{3}$$

ahol $\vec{j}$ a részecskék áramsűrűsége. Külső erő jelenléte nélkül és a részecskék közötti kölcsönhatás elhanyagolásával az áramsűrűség arányos és ellentétes irányú a koncentrációgradienssel, mivel az áramlás a magasabb koncentrációtól az alacsonyabb felé történik. Ez az arányossági tényező a diffúziós állandó (D), mely megmutatja a koncentrációkülönbség hatására meginduló részecskeáram nagyságát. Fick I. törvényét a következőképpen kapjuk:

$$\vec{j}(\vec{x},t) = -D\vec{\nabla}c(\vec{x},t) \tag{4}$$

Fick I. törvényét behelyettesítve a kontinuitási egyenletbe kapjuk Fick II. törvényét, azaz a diffúziós egyenletet:

$$\dot{c}(\vec{x},t) = D\Delta c(\vec{x},t) \tag{5}$$

A Fick-törvények korlátai közé tartozik, hogy az esetleges elektrosztatikus potenciálgradiensek hatásait nem veszi figyelembe. Emellett a diffúziós állandót konstansnak tekintik, noha ennek lehet hőmérséklet- és koncentrációfüggése, mely az egyenletek további bonyolódásához és analitikus megoldhatatlanságához vezet. Továbbá az a feltételezés is csak speciális esetekben érvényes, hogy a diffúziós állandó skalár mennyiségként kezelhető.

4.3.2. Einstein-törvény

Az Einstein-törvény összefüggést teremt a folyadékokban tapasztalható súrlódási együttható (viszkozitás) (γ) és a diffúziós állandó (D) között. A súrlódási együttható az energiadisszipáció mértékét írja le, a diffúziós állandó a részecskék termikus fluktuációjából eredő helyváltoztatását jellemzi. A statisztikában a két mennyiség kapcsolatát a fluktuáció–disszipáció elve határozza meg: termodinamikai egyensúlyban a fluktuációk által okozott változások disszipációt eredményeznek, mely viszont újabb fluktuációk forrása. A részecskék mozgására vonatkozó fluktuáció–disszipáció tétel az Einstein-törvény:

$$D = \frac{k_B T}{\gamma} \tag{6}$$

ahol k_B a Boltzmann állandó és T a hőmérséklet. Stokes meghatározta az r_H hidrodinamikai sugarú gömb alakú részecskék súrlódási együtthatóját (γ), abban az esetben, ha azok η viszkozitású, alacsony Reynolds számú közegben mozognak. A súrlódási együttható: $\gamma = 6\pi\eta r_H$. Ezt behelyettesítve (6)-be megkapjuk a Stokes-Einstein egyenletet:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \tag{7}$$

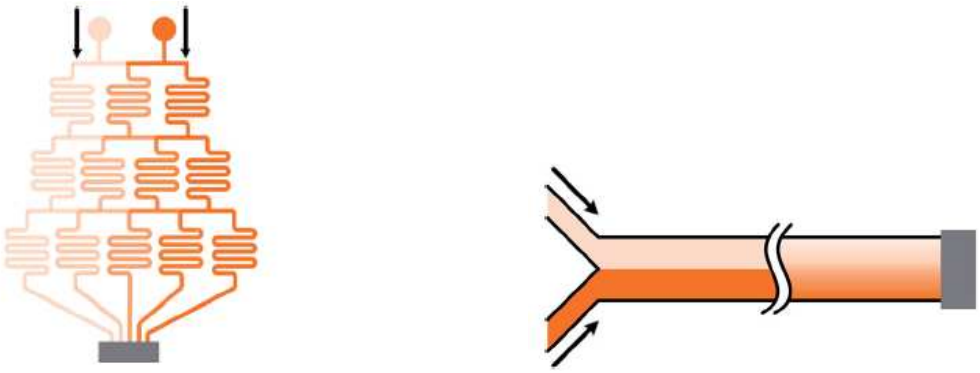
Ennek ismeretében részecskék, molekulák diffúziós állandója megbecsülhető, ha ismert a vizsgálandó molekula hidrodinamikai sugara és fordítva, a hidrodinamikai sugár meghatározható a diffúziós állandó ismeretében. Ez lehetővé teszi például a fehérjék méretének becslését a diffúziós állandójuk méréséből.

4.3.3. Kémiai gradiens kialakítása mikrofluidikai chipekben

A sejtek élő szervezeten belüli környezete különböző koncentrációjú kémiai anyagokból áll. Ahhoz, hogy a sejtek különböző hatóanyagokra adott válaszait a legpontosabban tudjuk vizsgálni a mikrofludikán belül, a lokális koncentrációértékek pontos előállítására van szükség. A kémiai gradiens létrehozására mind egyfázisú, mind többfázisú és csepp-alapú mikrofluidikai rendszerekben is van lehetőség.

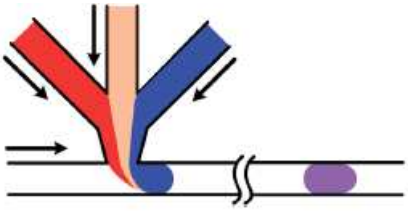
Egyfázisú módszer esetén a kémiai gradiens egy fázisban alakul ki, egy vagy több folyadék összekeverésével. Számos módszer létezik ennek elérésére, például a fa szerkezetű hálózatok vagy az egyszerűbb, Y-alakú csomópontok és elágazások, melyek működése a 4. ábrán látható. Fa alakú hálózat használatakor két vagy akár több kiindulási anyag összevezetésével és a megfelelő pontokon való szétválasztásával egy faszerű struktúra alakul ki, mely a rendszer végén előállítja a megfelelő térbeli koncentrációeloszlást. Az Y-alakú elágazás alkalmazása során a kiindulási anyagokat egy megfelelően hosszú csatornába vezetik, azok a csatorna hosszában előrehaladva, diffúzióval keverednek össze, így a kémiai gradiens a csatorna keresztmetszetében alakul ki.[34]

Ehhez hasonló megoldás a különböző anyagok membránnal történő elválasztása a köztes csatornától[35]. Ebben az esetben a kiindulási anyagok keveredését a membránon keresztüli diffúzió biztosítja.



4. ábra. Egyfázisú kémiai gradiens létrehozásához használt struktúrák: fa alakú hálózat (balra) és Y-alakú elágazás (jobbra)[36]

Csepp-alapú gradiens generálás során cseppeken belüli célzott koncentráció kialakítása a cél, különböző anyagok összekeverésével az eltérő fázisokon belül, például víz és olaj segítségével. A kialakuló csepp belső koncentráció-eloszlását a kiindulási anyagok arányával lehet finomhangolni (5. ábra).[37]



5. ábra. Csepp-alapú gradiens generálás[36]

4.4. Diffúzió mikrofluidikában

A mikrofluidikai rendszerek, például a Lab-on-a-Chip és az Organ-on-Chip eszközök alkalmazása hatékony módszert kínál a diffúziós jelenségek, különösen fehérjék viselkedésének és diffúziós tulajdonságainak vizsgálatára. Az említett rendszerek számos előnyt kínálnak a makroszkopikus módszerekkel szemben, mint például a kis mintatérfogatok pontos irányítása, az alacsony anyagfelhasználás és minimális anyagpazarlás, a könnyű gyárthatóság és a gyors, nagy áteresztőképességű mérés.[13,38,39] A diffúzió kulcsfontosságú szerepet játszik a mikrofluidikai rendszerek pontos koncentrációeloszlásának kialakításában, hiszen a fluidikai rendszereket jellemző alacsony Reynolds szám (Re < 1) miatt a folyadékáramlás a mikrochipek belsejében főként lamináris. A turbulencia hiánya miatt a különböző folyadékok keveredését maga a diffúzió hajtja, ami lehetővé teszi a diffúziós állandó mérését a Fick-törvények által leírt diffúziós profilok vizsgálatával.

Kémiai gradiens létrehozása kétféleképpen valósítható meg egy folytonos mikrofluidikai struktúrában: kényszerített áramlás alapú, illetve diffúzió alapú gradiens generálásával. Az áramlás alapú eszközök a lamináris áramlásban kialakuló, arra merőleges koncentrációgradiens segítségével határozzák meg a diffúziós állandót. Ilyen eszközök az Y-alakú elágazások[34,40], a H-alakú csatornák[41] vagy a T-alakú elágazások[42]. Ezek az eszközök azonban sejtes alkalmazásban megváltoztathatják a sejtek viselkedését az áramlás által gyakorolt nyírófeszültség miatt.[43–45] A diffúzión alapuló eszközök a koncentrációgrádienst kizárólag diffúzió útján hozzák létre. Ennek érdekében fizikai akadályokat, például membránokat vagy hidrogéleket alkalmaznak, melyek kiküszöbölik az esetleges áramlások hatását, például kemotaxis[43] és citotoxicitás[46] mérések során. Az ilyen akadályok alkalmazásának hátránya, hogy jelentősen lassítják a diffúziót.

Számos kísérlet használja a Gauss-függvényt a diffúziós profil időbeli és térbeli fejlődésének leírására, többek között a különböző mérési módszerek összehasonlítására,[47] a homogén és heterogén oldatok megkülönböztetésére[42] vagy a fehérjék és komplexeik jellemzésére[48]. Állandó forrás esetén azonban a diffúziós állandót a hibafüggvény komplementerével lehet leírni.[46] Állandó felületi koncentráció esetén a következő peremfeltételek adódnak: $c(z, t = 0) = 0$, $c(z = 0, t) = c_0$, $c(x = \infty, t) = 0$. A diffúziós egyenlet megoldása a komplementer hibafüggvénnyel írható le:

$$c(z,t) = c_0 \cdot erfc\left(\frac{z}{2\sqrt{Dt}}\right) \tag{8}$$

ahol a komplementer hibafüggvény:

$$erfc(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-t^2} dt \tag{9}$$

Munkám során célom olyan diffúzió alapú mikrofluidikai mérőcella létrehozása, mely akadályok nélkül, gyorsan képes a kémiai gradiens kialakítására, vizsgálatára és a célzott molekulák diffúziós állandóinak meghatározására. Az általam tervezett mikrofluidikai chipben a feltöltést követően a csatorna állandó forrásként funkcionált, így a diffúziós állandók meghatározásához a komplementer hibafüggvényt használtam.

4.4.1. Fehérjék diffúziós állandóinak meghatározása

Az elmúlt években számos módszert dolgoztak ki különböző mikrofluidikai rendszerek alkalmazásával molekulák, illetve fehérjék diffúziós állandójának meghatározására.[42,49,50] A fehérjék viselkedése megbecsülhető különböző diffúziólimitált rendszerekben, például gyógyszeradagolási rendszerek esetén, ahol a gyógyszerhatóanyagok adott helyre juttatása a diffúziótól függ, mint például bőrrétegeken keresztül vagy a vér-agy gáton át.[51–53] A fehérjék diffúziós együtthatói alapján becsülhető azok mérete, molekulatömege, hidratációs állapota, valamint az aggregáció mértéke.[41,42,50] Egy gömb alakú részecske molekuláris súlya $M = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho$, ahol r a molekula sugara ρ pedig a molekuláris sűrűsége. A molekuláris sűrűség függ a fehérje molekuláris tömegétől, viszont a legtöbb nagyméretű fehérje esetén ez állandó, így ρ = 1.3-1.4 g/cm^3.[54] A diffúziós állandó a (7) alapján a molekuláris súllyal kifejezve:

$$D = \frac{k_B T}{3\eta}\left(\frac{\rho}{6\pi^2 M}\right)^{\frac{1}{3}} \tag{10}$$

Egy molekula hidrodinamikai sugarának ismeretében a diffúziós együttható becsülhető, mely kísérleti úton igazolható.

4.5. Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia – EIS

Az Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia (EIS) egy bevett módszer például a fémek korroziójának, a festékrétegek kopásának, valamint a lítium-ion elemek és akkumulátorok teljesítményének vizsgálatára[55]. Biológiai alkalmazásait tekintve elterjedt eljárás a sejtek és sejtpopulációk különböző tulajdonságainak vizsgálatára, mivel nem invazív, jelölésmentes és valósidejű mérések elvégzésére is alkalmas[56]. Az EIS olyan területeken is széles körben alkalmazott, ahol ion- és molekulakoncentráció vagy más biológiai-diagnosztikai paraméterek meghatározása szükséges[57,58].

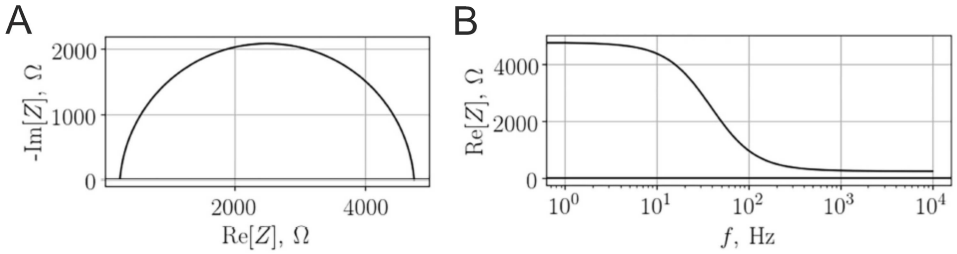
A váltóáram esetében használt impedancia (Z) az egyenáramú jelenségeknél használt ellenállással analóg mennyiség. Definíció szerint az impedancia a váltóáram és a váltófeszültség frekvenciafüggő hányadosa. A váltóáram leírására gyakran alkalmaznak komplex formalizmust, így az impedancia is egy komplex mennyiséggé válik, képzetes és valós résszel:

$$Z(f) = \frac{V(f)}{I(f)} = Re(Z) + i \cdot Im(Z) = |Z|e^{i\varphi} \tag{11}$$

Az impedancia abszolút értéke ($|Z|$) és az áram és feszültség közötti fáziskülönbség (φ) kifejezhető az impedancia valós és képzetes részével:

$$|Z| = \sqrt{Re(Z)^2 + Im(Z)^2} \qquad \varphi = \arctan\left(\frac{Im(Z)}{Re(Z)}\right) \tag{12}$$

Az impedancia valós része a vizsgált rendszer rezisztív részeit, a képzetes része (reaktancia) a rendszer kapacitív és induktív jellemzőit írja le. Az impedancia frekvenciafüggése miatt egy rendszer teljes jellemzéséhez széles frekvenciatartományon végzett vizsgálat szükséges, melynek eredménye az impedanciaspektrum. Ennek megjelenítésére kétféle ábrázolási módszer terjedt el. A Nyquist-diagram az impedancia valós részéhez a képzetes rész negatív értékeit rendeli, míg a Bode-diagram a frekvencia logaritmusának függvényében ábrázolja az impedancia nagyságát vagy fázisát (6. ábra). A különböző ábrázolások alapján a vizsgált rendszer karakterisztikus paraméterei leolvashatóak a kapott grafikonokról. A Nyquist-diagram esetén a jellegzetes félkör kezdete adja meg az oldat ellenállását, a vége az oldat ellenállása és a töltésátadási ellenállás (R_{ct}) összege, maximuma pedig az $\omega = 1/R_{ct}C_{DL}$, melyből meghatározható az elektromos kettősréteg kapacitása (C_{DL})[59].



6. ábra. Az impedanciaspektrum tipikus példái: (A) Nyquist-diagram és (B) az impedancia nagyságának Bode-diagramja[59]

4.5.1. Az impedancia meghatározó tényezői elektrolitokban

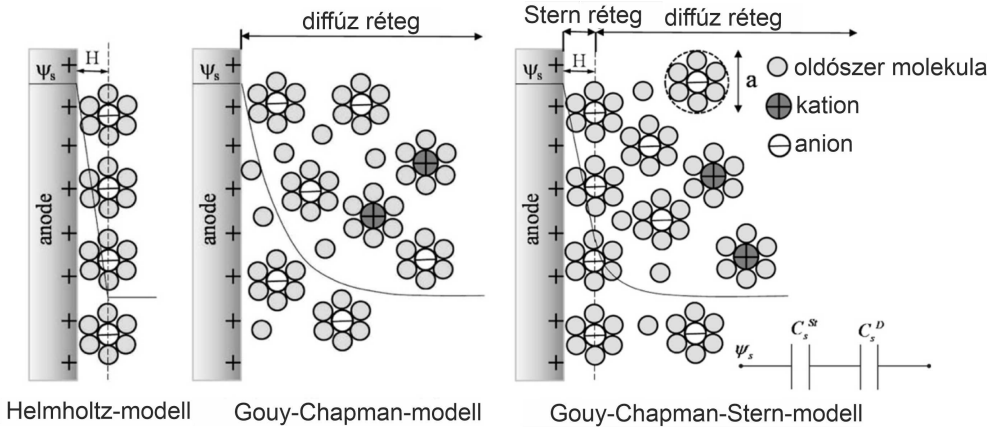
Az EIS mérések során a mért spektrumot erősen befolyásolja a közeg összetétele, az oldat ionkoncentrációja és vezetőképessége. Elektrolitok esetén az impedanciát nagyban meghatározza az oldat ellenállása (R_s), mely az elektródák közötti ionmigrációból származó áramhoz kötődik. Ez függ az ionok koncentrációjától, típusától és mozgékonyságától, azaz a vezetőképességtől (κ), a vezető csatorna hosszától (l) és a keresztmetszetétől (A):

$$R_s = \frac{l}{\kappa \cdot A} \tag{13}$$

Ennek megfelelően a nagy elektródafelület és ionkoncentráció, valamint a kis elektródatávolság csökkenti az impedanciát.

Egy másik fontos jelenség az elektróda-elektrolit határfelületen kialakuló kapacitív elektromos kettősréteg (C_{DL}), melyet az elektródafelületen felhalmozódó többlet töltés és az oldatban található ellentétes töltésű ionok elektrosztatikusan kötött rétegei alakítanak ki. Ennek leírására számos modell létezik (7. ábra)[60]. A Helmholtz-modell szerint az elektrolitban található ellentétes töltésű ionok az elektróda felületén réteget képeznek. Ez megfeleltethető egy kondenzátor két ellentétes töltésű lemezének, így ez a legegyszerűbb közelítés a modellek közül. A Gouy-Chapman-modell a kialakuló töltésréteget diffúz módon kezeli, így ez függ az elektróda töltéssűrűségétől, az alkalmazott potenciáltól és az oldat koncentrációjától. A modell limitációja, hogy nem veszi figyelembe az ionok véges méretét. Ezt a Stern-modell korrigálja azzal, hogy az elektródához közeli, Helmholtz-réteghez hasonló, egy-két ion vastag fix Stern-réteget definiál, majd az elektródától távolabb diffúz réteget alkalmaz.[61]

A töltésátviteli ellenállás (R_{ct}) az elektróda és az oldatban található elektroaktív molekulák közötti elektronátadási reakcióhoz kapcsolódik[59]. Ez a paraméter többek között függ a reakciókinetikától, az ionkoncentrációtól, a potenciáltól és az elektróda felületének állapotától. Az elektrokatalitikusan aktív felületű elektródák esetében az R_{ct} értéke kicsi.

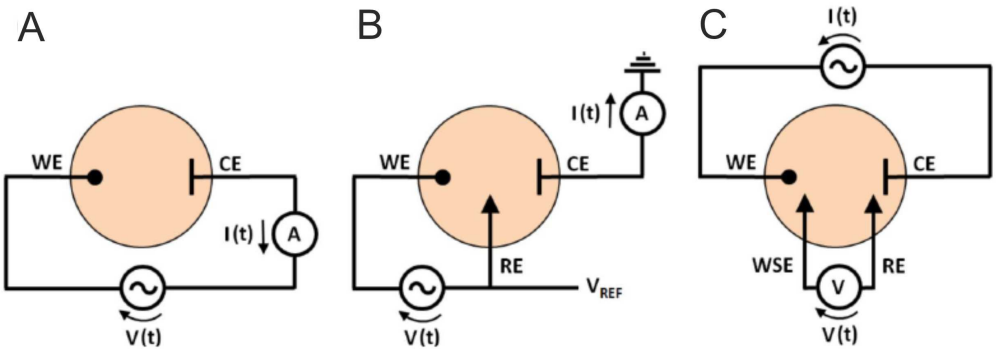


7. ábra. A kettősréteg modellek tipikus példái[60]

A kapacitások ideálistól eltérő viselkedésének leírására az állandó fáziselem (CPE) szolgál, mely a kondenzátorok nem ideális viselkedését is figyelembe veszi[59]. Valós elektródák esetén például az elektródafelület érdessége, a felületi szennyeződések vagy akár az adszorbeált vegyületek is okozhatnak eltérő viselkedést. A CPE fázisszöge független a frekvenciától, viselkedésének leírására egy kitevőt alkalmaznak (n), mely értéke $0-1$ között változik, ahol 1 az ideális kapacitás, 0 pedig az ideális ellenállást írja le. A diffúziós folyamatok és a végtelen féltérben lejátszódó anyagtranszport leírására a Warburg-elemet használják (W), mely a spektrum alacsonyfrekvenciás részén egy 45°-os egyenest eredményez[62]. A Warburg-elem a CPE $n = 0.5$ határesete.[61]

4.5.2. Impedancia mérés során alkalmazott elektróda konfigurációk

Az EIS mérések során különböző számú, anyagú és geometriájú elektródákat használhatunk a rendszer karakterizálására[63]. A használt elektródák száma nagyban befolyásolja a mért spektrum és a kinyerhető információ tulajdonságait. A legtöbb esetben a két-, illetve négy-elektródás elrendezést használják, de három-elektródás elrendezés is előfordul (8. ábra). A két-elektródás mérés során a gerjesztés és a mérés ugyanazon elektródákon történik, a munkaelektróda (WE) és az ellenelektróda (CE) között. Az elektródák és az oldat közvetlen érintkezése miatt a felületi hatások is befolyásolják a mért görbéket, mint például a kontakt impedancia, illetve a megjelenő parazita effektusok és kapacitások[64]. Ennek elkerülése végett egy harmadik, referencia elektróda (RE) bevezetésével a gerjesztés a munka- és a referencia elektróda között alkalmazható, a mérés pedig az ellenelektróda segítségével történik, így a mért jelet csak a munkaelektróda felületi kölcsönhatásai befolyásolják[65]. Még egy további elektróda bevezetésével (munka-érzékelő elektróda - WSE) ez a hatás is kiküszöbölhető: a gerjesztés a két szélső elektródán történik, a mérés pedig a két belső elektróda között zajlik, így a jel nem tartalmazza a felületi kölcsönhatások hatásait. A négy-elektródás elrendezés segítségével növelhető a mérés érzékenysége, illetve minimalizálható a kontakt impedancia, ami lehetővé teszi biológiai minták kizárólag elektromos tulajdonságainak vizsgálatát[66].



8. ábra. Az EIS mérések során alkalmazott különböző elektróda elrendezések (A) két-elektródás, (B) három-elektródás és (C) négy-elektródás esetben[65]

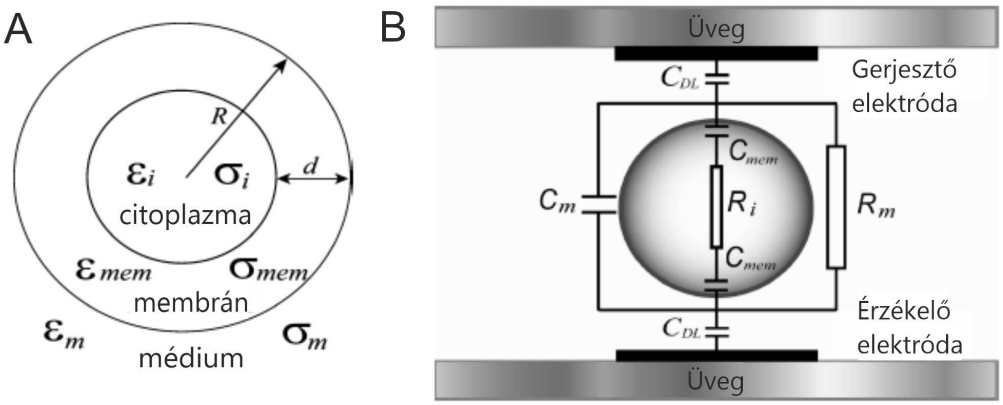
4.6. Sejtanalitika impedancia spektroszkópiával

4.6.1. Sejtmodellek

Az impedancia spektroszkópia hatékony módszer a sejtek viselkedésének és tulajdonságainak vizsgálatára, mivel az impedancia spektrumra illeszthető elektromos ekvivalens áramköri modell segít meghatározni a rendszer paramétereit. Többféle modell létezik, a vizsgált sejtek típusától függően leggyakrabban az egy- és kéthéj modellt alkalmazzák[67,68].

Az élő sejtek egyik legegyszerűbb elektromos modellje az úgynevezett egyhéj (single-shell) modell. Ez a modell azt feltételezi, hogy a sejthártya vékony, szigetelő plazmamembránból áll, amelynek belsejét vezető citoplazma tölti ki.[67]. Az egyhártyás modell sematikus ábrája a 9. ábrán látható. A plazmamembránnak, a citoplazmának és a sejtet körülvevő közegnek jellemző a saját permittivitása ($\varepsilon_{mem}, \varepsilon_i, \varepsilon_m$) és konduktivitása ($\sigma_{mem}, \sigma_i, \sigma_m$).

A baktériumok és élesztősejtek esetében a plazmamembránt sejtfal veszi körül. Ebben az esetben az egyhártyás modell nem elegendő a sejtek elektromos tulajdonságainak leírására, Asami egy olyan kéthártyás modellt javasolt, melyben a citoplazmát két koncentrikus membránréteg határolja[68]. Ez jóval bonyolultabb modell, így az irodalomban általánosan az egyhártyás modellt alkalmazzák egyszerűbb, például élesztősejtek esetében is[69–71].



9. ábra. Egyhártyás sejtmodell oldatban (A) és az elektródák között elhelyezkedő sejt ekvivalens áramköri modellje (B)[67]

4.6.2. Ekvivalens áramköri modellek

Az ekvivalens áramköri illesztés olyan módszer, melyet elektrokémiai és sejtes alkalmazásokban a rendszer elektromos modellezésére használnak. A módszer célja a rendszerben lejátszódó kémiai és biológiai folyamatok és jelenségek modellezése egzakt áramköri elemekkel, valamint azok változásainak nyomon követése[63]. Az ekvivalens áramkör alapvető elemei lehetnek ellenállások (közeg), kondenzátorok (membránok, kettős rétegek) vagy induktivitások, illetve speciális elemek, melyek sorosan vagy párhuzamosan kapcsolódhatnak. Ezek az elemek valós fizikai folyamatokhoz köthetőek, például az oldat ellenállásához (R_s), a töltésátviteli ellenálláshoz (R_{ct}) vagy az elektromos kettősréteg kapacitáshoz (C_{DL}), a konstans fáziselemhez vagy a diffúziós folyamatokat leíró Warburg-elemhez. Az EIS-el végzett biológiai tesztek esetén az egyik leggyakrabban mért paraméter az R_{ct}, ami mellett C_{DL}-nek van nagy szerepe a határfelületen kialakuló impedanciában[59]. Sejtek esetén további elem a sejtmembrán kapacitása (C_m) és a citoplazma ellenállása (R_i) is.[61]

Az irodalomban használt két legelterjedtebb ekvivalens áramköri illesztési módszer más és más fizikai jelenségek leírására alkalmas. A Randles-modell egy egyszerűbb modell, mely a felületi elektrokémiai folyamatokat írja le, így egyaránt alkalmas az elektródák vagy az mikrofluidikai csatornák impedanciájának, illetve a felületi módosítások vagy a redox-reakciók hatásainak leírására[72]. A Cole–Cole-modell egy bonyolultabb módszer, mely a biológiai minták diszperziós viselkedését írja le, így élő sejtek és szövetek behatású vizsgálatánál előnyös[73]. A mérésekhez illő modell kiválasztása a mikrofluidikai chip domináns fizikai folyamataitól függ, mint például az elektróda–elektrolit határfelület elektrokémiai folyamatai, a diffúzió, valamint a sejtek dielektromos tulajdonságai.

A Randles-modell az EIS egyik legalapvetőbb ekvivalens áramköri modellje, mely az elektróda–elektrolit határfelület jellemző fizikai folyamatait veszi figyelembe[72]. A modell tipikusan az oldat ellenállását (R_s), az elektromos kettősréteg kapacitását (C_{DL}), a töltésátadási ellenállást (R_{ct}), valamint a Warburg-impedanciát (Z_W) tartalmazza. A modell Nyquist-diagramja ideális esetben egy tökéletes félkörből és egy 45°-os diffúziós szakaszból áll (10.A ábra). A modell komplex impedanciája ($Z(j\omega)$) a következőképpen számolható:

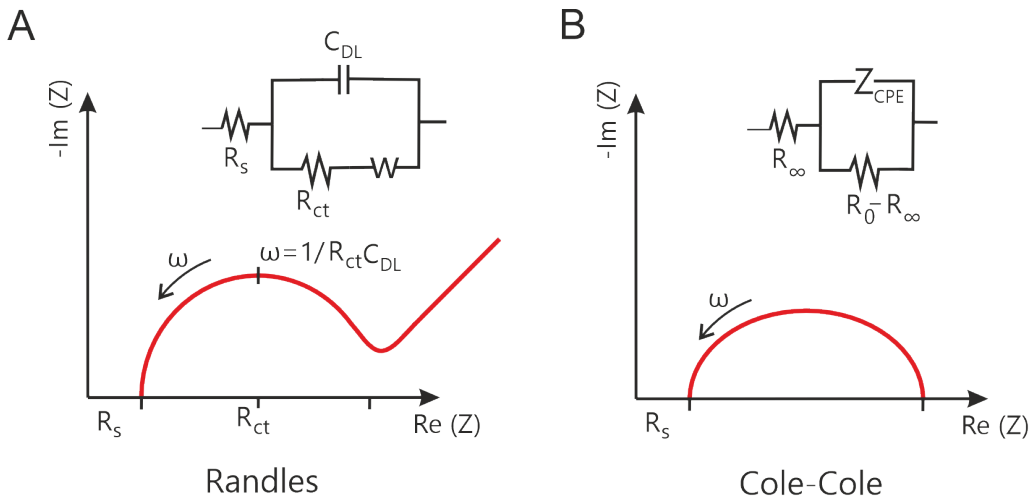
$$Z(i\omega) = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + j\omega R_{ct} C_{DL}} + Z_W \tag{14}$$

ahol ω a körfrekvencia és i a képzetes egység. A mikrofluidikai rendszerek esetében a Randles-modell különösen elterjedt, ha az elektródafelületen található sejtek, bioszenzorok felülete vagy redox-reakciók vizsgálata a cél[74]. Ez a modell pontos képet ad az elektródfelületen zajló reakciókról és a mikrofluidikai csatornát jellemző ohmos hozzájárulásról[75]. A mérések során az R_{ct} hangsúlyos paraméter a rendszer változásainak jellemzésére, mivel érzékenyen reagál az elektróda felületi állapotának változásaira, például sejtréteg kialakulására és a sejtek viabilitására.[76].

A Cole–Cole-modell a biológiai rendszerek, mint például a sejtek és szövetek frekvenciafüggő impedancia-diszperzióját írja le, melyet a membrán polarizációja, illetve az intra– és extracelluláris ellenállások határoznak meg[73]. A modell Nyquist-diagramja jellegzetesen egy lapított félkör, melynek alakját egy α paraméter határozza meg a biológiai minták eltérő relaxációs folyamatai következtében (10.B ábra). A modell komplex impedanciája a következőképpen számolható:

$$Z(i\omega) = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (i\omega\tau)^\alpha} \tag{15}$$

ahol R_0 a 0 Hz frekvenciához tartozó ellenállás, R_∞ Hz a ∞ frekvenciához tartozó ellenállás, τ az időállandó. A sejtek impedanciáját főként a membránkapacitás befolyásolja, ezért a Cole–Cole-modell remekül alkalmazható sejtkonfluencia, sejtnövekedés, életképesség, vagy membránintegritási vizsgálatokra[77,78].

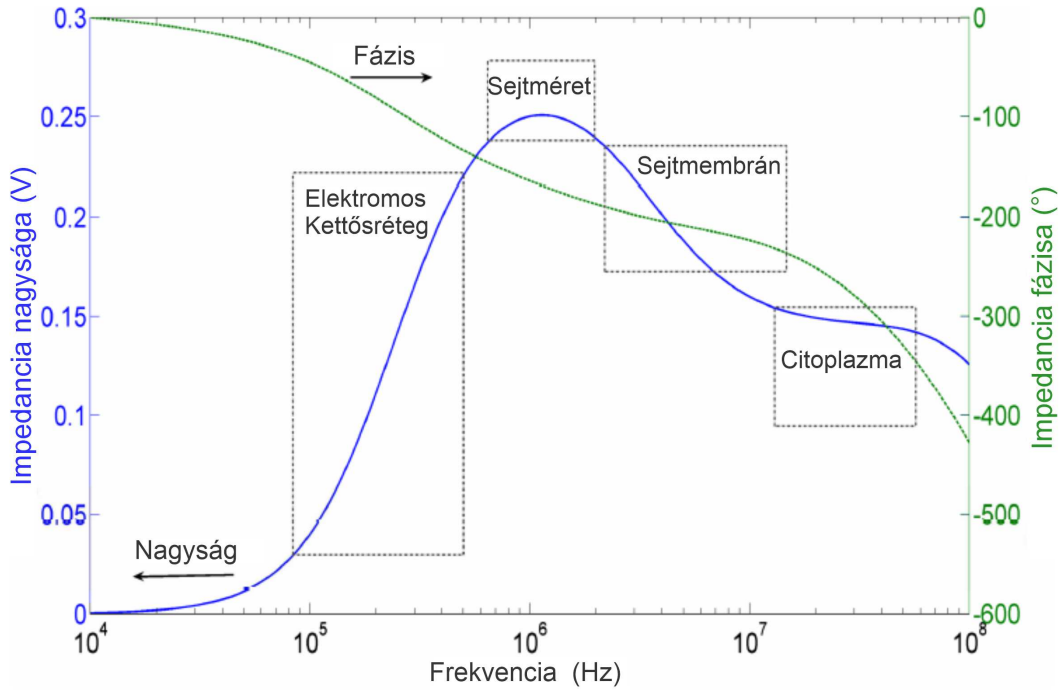


10. ábra. (A) A Randles és (B) Cole-Cole modellek Nyquist-diagramjai

4.6.3. Karakterisztikus tartományok

Az impedancia spektroszkópia széles körben használt módszer sejtek tulajdonságainak vizsgálatára, illetve élő és halott sejtek megkülönböztetésére[79–82]. Különböző frekvenciatartományok elemzésével a sejtek különböző tulajdonságait vizsgálhatjuk. Az irodalomban három tartományt szokás elkülöníteni: az α diszperziós régiót (1 Hz - pár kHz), ahol az elektróda polarizációjának hatásai dominálnak, a β tartományt (pár kHz - 1 GHz), ahol a plazmamembrán és az oldat, illetve a citoplazma és az oldat kölcsönhatását vizsgálhatjuk, valamint a γ régiót (> 1 GHz), ahol a vízmolekulák tulajdonságai, reorientációja dominál[83,84]. A sejtek tulajdonságainak vizsgálatához a β régió a legmegfelelőbb. A β tartomány két részre osztható: 1–10 MHz, illetve 10 MHz–1 GHz közötti tartományokra[67]. Az alsó tartományban a plazmamembrán és a közeg határfelületének töltődése figyelhető meg, míg a felső tartományban, ahol a frekvencia elég magas, a sejtmembrán rövidzárként viselkedik, és a töltődés a citoplazma és a környező közeg között megy végbe.

A sejtek tulajdonságainak vizsgálatához a megfelelő frekvenciatartomány a β-diszperziós szakasz, ahol a membrán és a citoplazma hatásai is tanulmányozhatóak. Az említett diszperziós tartományokat a 11. ábra demonstrálja egyetlen sejt szimulált impedanciaspektrumán, az elektromos kettősréteg hozzájárulásának figyelmen kívül hagyásával[67].



11. ábra. A jellegzetes frekvenciatartományok Bode-diagramja egysejt-szimuláció alapján[67]

4.6.4. Az EIS alkalmazásai mikrofluidikai rendszerekben

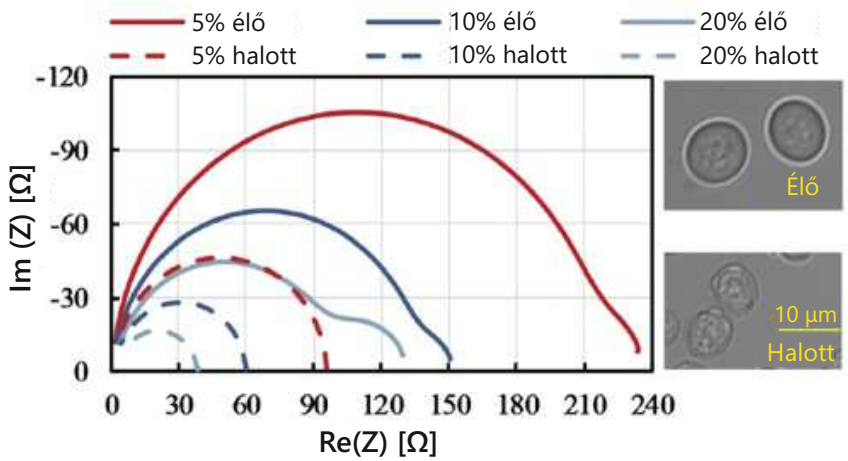
A sejtek viselkedésének monitorozására alkalmas ideális érzékelő jelölésmentes (label-free), nem invazív és valós idejű megfigyelést tesz lehetővé, mely biztosítja a folyamatos mintavétel és elemzés lehetőségét, valamint megbízható és magas minőségű adatgyűjtést. A különböző szenzortípusok közül a leggyakrabban alkalmazottak az optikai és elektromos érzékelők[26,85]. Az optikai detektálási módszerek azonban gyakran fluoreszcens festékeket alkalmaznak, melyek megváltoztathatják a sejtek viselkedését és csökkenthetik azok életképességét[86–88].

Az impedancia spektroszkópia alkalmas sejtek és sejttenyészetek különböző tulajdonságainak in-situ jellemzésére, mivel lehetővé teszi a nem invazív, valós idejű méréseket[89]. Az utóbbi években jelentősen felgyorsult az olyan mikrofluidikai eszközök fejlesztése, melyek célja elektródák integrációjával és az EIS alkalmazásával sokoldalú bioszenzorok létrehozása[90]. Integrált mikroelektródák használatával ezek a mikrofluidikai rendszerek alkalmasakká válnak egyedi sejtek vagy sejtkultúrák impedanciaalapú sejtelemzésére[89], a konfluencia és a sejtszám meghatározására[91], a külső ingerekre adott válaszok mérésére[92], sejtek csapdázására és növekedésük nyomon követésére[70], illetve baktériumok detektálására és jellemzésére is[93,94]. Az alkalmazások között széles körben elterjedt az átáramlásos citometria (flow cytometry) és az impedanciamérés kombinációja, mely a sejtek általános állapotának jellemzésére szolgál[95,96]. Ez a módszer alkalmas a csatornákban áramló sejtes mintaoldat nagy sebességű vizsgálatára, és a csatornában elhelyezkedő elektródák használatával lehetővé teszi nagyszámú sejt gyors elemzését és szelekcióját, habár a módszer nem alkalmas az egyedi sejtek hosszú távú vizsgálatára[97]. A chipen belüli sejtcsapdázás megvalósításával viszont egyedi sejtek hosszú távú viselkedése is tanulmányozható stabil környezetben, például egyetlen - kutatásban széles körben alkalmazott méhnyakrák sejtvonalból származó - HeLa sejt folyamatos monitorozásával[98], baktériumok egyedi anyagcseréjének nyomon követésével[94], vagy akár egyedi sejtek impedanciatomográfiával való vizsgálatával[99].

A sejtes vonatkozású mikrofluidikai rendszerekben gyakran használják modellként az élesztősejteket a kezdeti tesztekben, mivel könnyen tenyészthetők, gyorsan szaporodnak és egyszerű velük dolgozni[100]. Számos EIS alkalmazás során élesztősejtekkel tesztelik a tervezett rendszerek csapdázási és analitikai funkcióit, mivel ezek geometriai tulajdonságai hasonlóak a humán vérsejtekéhez (5-10 μm)[69]. Az élesztősejteken túl azonban a mikrofluidikai rendszerek adaptálhatók más sejttípusok, például HeLa és más ráksejtek impedancia-alapú analíziséhez is[89,98]. Élő sejtek és szövetek vizsgálata során alapvető fontosságú a külső környezeti hatások minimalizálása és a szerkezeti károsodások elkerülése. Ezért az olyan elektromos érzékelési módszereket, mint az EIS, valamint az ezen alapuló transzepiteliális/endoteliális elektromos ellenállás és az elektromos sejt-szubsztrát impedancia mérést gyakran integrálják a különböző OoC rendszerekbe[26,101].

Az EIS általános és részletes vizsgálatokra alkalmas, mivel széles frekvenciatartományt fed le, és rugalmas elektróda-konfigurációk kialakítását teszi lehetővé[70,102]. Ez egy széles körben alkalmazott technika, mely valós idejű mérések révén alkalmas a sejttulajdonságok, például az életképesség, a szerkezeti integritás, az adhézió és a citotoxicitás vizsgálatára[90,91,103]. A módszert széles körben alkalmazzák mikrofluidikai rendszerekkel kombinálva, mivel könnyen integrálható és számos előnnyel rendelkezik. Ezek közül kiemelhető a nagy érzékenység, valamint a sejtek valós idejű nyomon követése saját mikrokörnyezetükben[74]. A technika további előnye, hogy a vizsgált rendszert ekvivalens áramkörrel modellezhető, mely lehetővé teszi az elektromos paraméterek — például az ellenállások és vezetőképességek — meghatározását mind az elektródák, mind a sejtek esetében[71,104].

Az élő és halott sejtek optikai megkülönböztetésére gyakran fluoreszcens festést alkalmaznak, például propidium-jodid nukleinsavfestéket[82,105]. Ez a sejt halála esetén a sejtmembrán áteresztése miatt bejut a sejtmagba, és megfesti azt. Megjegyezendő viszont, hogy stressz hatására is permeábilissá válhat a membrán, ami hamis festést eredményezhet[105]. Ez a jelenség megfelelő relaxációs idővel elkerülhető. Az élő és halott sejtek megkülönböztetése impedanciájuk nagyságának vizsgálatával is lehetséges, mivel az elpusztult sejtek sejtmembránjának áteresztése megnő, nő a vezetőképességük, ezáltal impedanciájuk lecsökken, és fázismenetük megváltozik[71,106]. Érdekes, hogy a sejtek számának növelése is csökkenést okozhat az impedanciában. Ezt az okozza, hogy a sejtek ionokat cserélnek az oldattal, ami több töltött részecskét eredményez a közvetlen közelükben, melyek az elektróda felszínén adszorbeálódni tudnak, növelve a kettősréteg vezetőképességét[71]. Az impedancia változását élő és halott élesztősejtek koncentrációjának függvényében a 12. ábra mutatja.

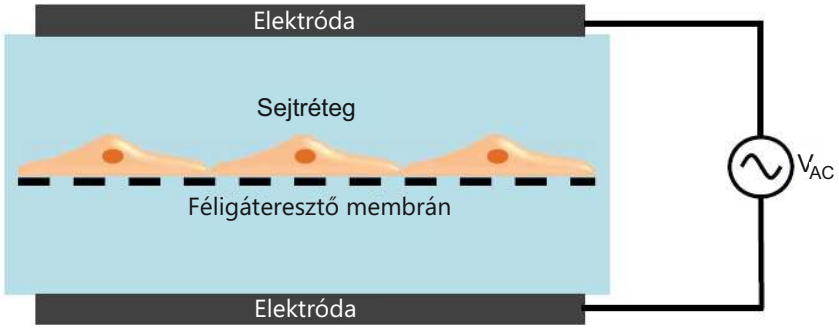


12. ábra. Az élesztősejtek életképességének hatása az impedanciára különböző koncentrációk mellett, Nyquist-diagramon ábrázolva[71]

4.7. Impedancia spektroszkópia, mint sejtanalitikai módszer

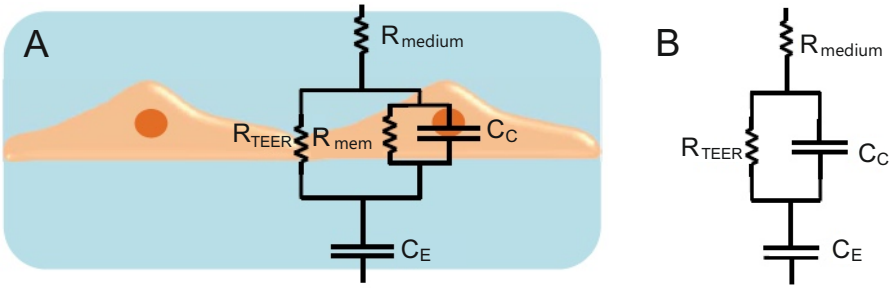
4.7.1. Transzepithelialis/Transzendoteliális Elektromos Ellenállás

A Transzepiteliális/Transzendoteliális Elektromos Ellenállás (TEER) egy rendkívül hatékony technika, mellyel a szövethatáron keresztül eső elektromos ellenállás mérésével jellemezhető a sejtrétegek integritása, permeábilitása és funkcionális viselkedése[107]. A mérési módszer segítségével főként hámsejtek, azaz az epiteliális vagy endoteliális sejtek rétegeinek integritását és kémiai anyagokra vonatkoztatott áteresztését vizsgálják. Ennek érdekében a sejteket membránokon tenyésztik, és elektródákat helyeznek el a membrán mindkét oldalán, hogy mérjék a barrieren keresztüli feszültségesést (13. ábra). Az OoC modellekben a TEER-t széles körben alkalmazzák, például a vér–agy gát[108,109], a tüdő[110], a bélrendszer[111] és a bőr[112] vizsgálatára.



13. ábra. TEER mérés során az elektródák egy porózus membrán két oldalán helyezkednek el[113].

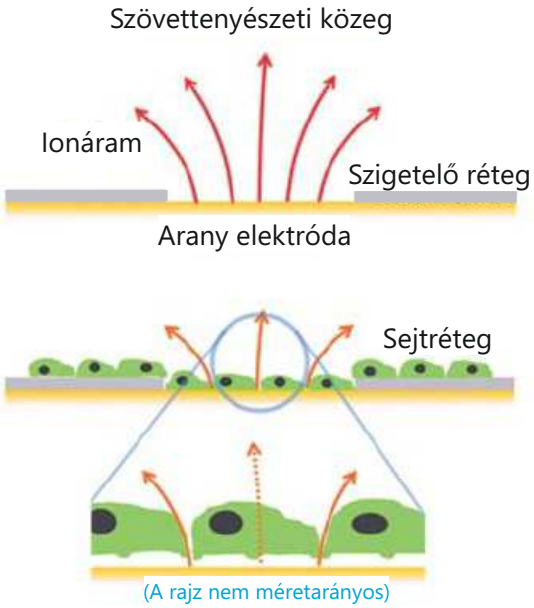
A TEER mérések során az ionáram vagy a sejteken keresztül vagy azok között tud folyni. A sejtek ekvivalens áramköre a következő elemekből áll: a szomszédos sejtek közötti kis távolságból adódó ellenállás (R_{TEER}), a sejtek ellenállása (R_{mem}) és kapacitása (C_C), a tápközeg ellenállása, valamint az elektródák kapacitása (C_E) (14.A ábra). A sejtek maguk alig járulnak hozzá az ionáramhoz a membránjaikból adódó nagy ellenállás miatt, így ennek járuléka elhanyagolható. Az egyszerűsített áramkörben csak a sejtek kapacitását vesszük figyelembe (14.B ábra).



14. ábra. TEER mérés esetén (A) a sejtek ekvivalens áramköri modellje és (B) az egyszerűsített modell[113]

4.7.2. Elektromos Sejt-Szubsztrát Impedancia Érzékelés

Az Elektromos Sejt-Szubsztrát Impedancia (ECIS) technika a TEER-től abban különbözik, hogy a sejtek növesztése ko-planáris elektródák felületén zajlik. A rendszeren mért impedancia megváltozik, amikor a sejtek kitapadnak az elektróda felszínére, a sejtek membránjainak szigetelő tulajdonságának köszönhetően a letapadt sejtek akadályozzák az ionok elektródák közötti áramlását, ahogy az a 15. ábrán látható. További változást okoz az impedanciában, ha a sejtek formája vagy helyzete megváltozik[114]. A sejtekkel telített elektróda impedanciája több paramétertől is függhet. Ilyen paraméter például az elektróda saját impedanciája, a szomszédos sejtek közötti ellenállás, illetve a sejtek membránkapacitása[115]. Ezt a módszert a sejtek növekedésének, terjedésének, tapadásának nyomon követésére, morfológiájának és életképességének vizsgálatára használják[46,115,116].

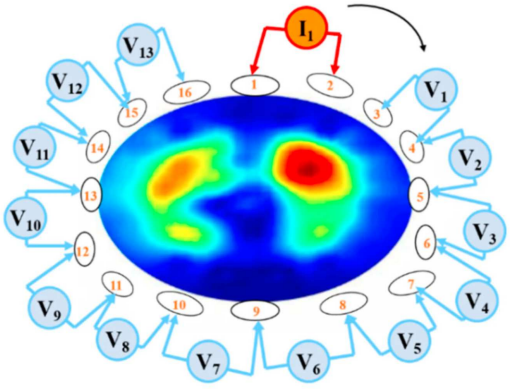


15. ábra. ECIS mérés során a sejtek kitapadnak az elektródára, ezzel gátolják az elektródák közötti ionáramot[114].

4.7.3. Impedancia tomográfia

Az EIS egyik jól ismert alkalmazása az elektromos impedancia tomográfia (EIT), melynek legelterjedtebb makroszkopikus alkalmazása a testösszetétel-analízis, azonban ígéretes lehetőségeket kínál a célzott orvosi diagnosztikai vizsgálatokban, például tumorok detektálásában és a rákkutatásban is[117,118]. A módszer alkalmazása során a testen kör alakban elhelyezett elektródák segítségével, és a közöttük történő impedanciamérések alapján rekonstruálható a test vagy a szövetek belső szerkezete, így a kinyert adatokból képet kaphatunk a vizsgált terület belső struktúrájáról (16. ábra). A hagyományos EIT egyik hátránya, hogy csak kvalitatív információt szolgáltat a szövetszintű paraméterekről, és nem rendelkezik a sejtszintű analízishez szükséges felbontással[119]. Ez a limitáció miniatürizáció segítségével feloldható, mely lehetővé teszi a nagy felbontású EIT alkalmazását a sejtnövekedés, a szerkezeti változások és a terápiás kezelések hatásainak in situ, 3D monitorozására[120].

Az elmúlt években számos eszköz fejlesztése irányult az egyedi sejtek vizsgálatára tomográfiás módszerekkel, akár sejtcsapdázás, akár áramlási citometria (flow-cytometry) alkalmazásával[99,121]. Ezekben a rendszerekben az integrált elektródák segítségével az impedancia adatok rögzíthetőek, melyekből különböző algoritmusok segítségével a sejtszerkezet rekonstrukciója elvégezhető. Továbbá az AI-alapú adatfeldolgozási módszerek elterjedésével lehetővé vált a sejtek képi megjelenítése a hagyományos tomográfiás rekonstrukciós algoritmusok kikerülésével[122]. A jelenleg elérhető eszközök alkalmasak például a hemolízis dinamikájának követésére[121], valamint ugyanazon szövetből származó egyedi sejtek heterogenitásának vizsgálatára[99]. Az EIT hatékony eszköznek bizonyult a daganatok korai kimutatásában is[123], képes a tumorok valós idejű monitorozására[124], valamint a jó- és rosszindulatú elváltozások megbízható megkülönböztetésére[125]. Az említett új EIS- és EIT-alapú megközelítések kulcsfontosságúak lehetnek a nem invazív onkológiai diagnosztikai módszerek kialakításában is[117].



16. ábra. Az impedancia tomográfia sematikus ábrája, mely mutatja a körben elhelyezett elektródákat. A különböző elektródák közötti méréssel kép alkotható a belső struktúráról[126].

Az EIT módszer jelenlegi legjelentősebb korlátja az inverz probléma megoldásának szükségessége a képrekonstrukció során[127]. Ennek a rendkívül összetett matematikai és fizikai problémának a kezelése és megoldása olyan korszerű algoritmusokat igényel, melyek komplexitása jelentősen befolyásolja az EIT képek érzékenységét és felbontását[127]. Habár a fenti eljárások lehetővé teszik a kvalitatív analízist, kvantitatív analízisre nem alkalmasak, ezért szükség lehet egy olyan mérési elv kialakítására, mely csökkenti a technika korlátait és megoldja a kvantitatív kiértékelést.

A mikrofluidikai rendszerek és az EIT ötvözésével olyan eszköz készíthető, mely segítséget nyújthat a sejtek, illetve sejtcsoportok helyfüggő tulajdonságainak beható elemzésére vagy szerkezetük részletes, nagy felbontású, valós idejű, akár 3D-s vizsgálatára, mely fontos lépés lehet a gyógyszerhatóanyag vizsgálatokban, a személyre szabott gyógyászatban és a diagnosztikában.

4.8. Sejtcsapdázási módszerek

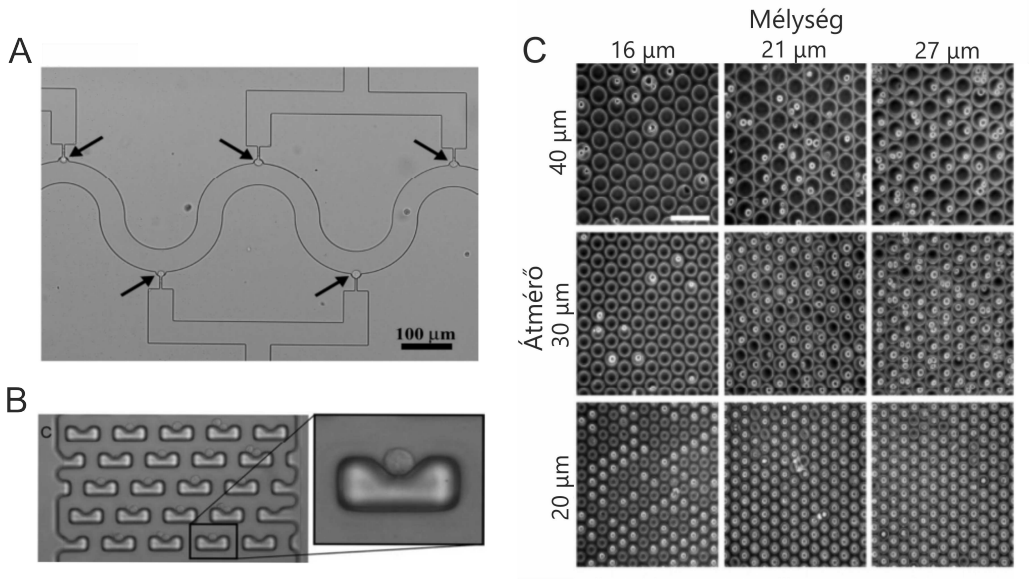
A mikrofluidikai rendszerek rugalmasan tervezhető struktúrái, kis méretük, alacsony mintaigényük és számos érzékelési technikával történő párhuzamos alkalmazhatóságuk miatt lehetőséget biztosíthatnak különböző sejtek csapdázására és egyidejű vizsgálatára. A sejtek manipulációjára léteznek aktív és passzív megoldások, melyek a célsejtek lokalizációja mellett lehetővé teszik sejtanalitikai mérések elvégzését akár optikai vagy elektrokémiai úton is. A mikrofluidikai rendszerek alkalmasak a minták nagy áteresztőképességű, párhuzamos kezelésére és vizsgálatára, így statisztikailag megbízható egysejt-elemzést tesznek lehetővé[128,129]. A sejtek csapdázására többféle mikroméretekben kivitelezhető módszer is létezik[130,131], például hidrodinamikai[132], elektromos[133], optikai[134], mágneses[135] vagy akusztikus[136] technikák. Az egysejtes analízis esetén általában nem elegendő egyetlen vizsgálati módszer alkalmazása a beható elemzésekhez, ezért rendszerint két vagy több technikát integrálnak a mikrofluidikai rendszerbe. Különböző detektálási módszerek, mint például a fluoreszcens mikroszkópia vagy a Raman spektroszkópia, kombinálhatóak a mikrofluidikai rendszerekkel, melyek ezáltal komplex vizsgálatokat tesznek lehetővé[130,137].

Az aktív és passzív manipulációs módszerek felosztása mellett megkülönböztetünk kontakt és kontaktusmentes technikákat is. Aktív módszereknek nevezzük azokat, melyek valamilyen külső erőforrás segítségével valósítják meg a sejtek mozgatását vagy csapdázását, míg azokat, melyek nem alkalmaznak külső erőt passzív módszereknek hívjuk. Ezek általában a csatornák geometriai kialakításával, vagy affinitás alapú felületmódosítási megoldásokkal, például antitestek használatával képesek a sejtcsapdázásra. A kontaktusalapú módszer esetén a részecske közvetlenül érintkezik a csapdázási régióval. Ez a módszer nem igényel külső energiát, mivel kizárólag a hidrodinamikai erőkre támaszkodik. Ezzel szemben a kontaktusmentes megközelítés esetén a részecske nem érintkezik fizikailag a csapdázási régióval. Ez a módszer jellemzően külső energiaforrást is igényel, például elektromos vagy mágneses teret. A különböző manipulációs eljárások alapulhatnak valamilyen fizikai paraméterben való eltérésen, mint például a sejtek vagy részecskék formája, nagysága vagy dielektromos tulajdonsága, így a mikrofluidikai rendszerbe integrálhatóvá válik a dielektroforézis, az akusztoforézis, a magnetoforézis, vagy akár az optikai csipesz módszere.

4.8.1. Hidrodinamikai csapdázás

A hidrodinamikai csapdázás módszere egy passzív, kontaktusalapú módszer, mely mechanikai struktúrákkal vagy akadályokkal valósítja meg a sejtek szeparációját. A módszer lényege a fő áramlási csatorna és a szűkebb mellékcsatornák áramlásainak szabályzása, mely során az elágazásokon átáramló kis mennyiségű folyadék a sejteket a mellékcsatornákba vezeti (17.A ábra). A hidrodinamikai csapdázás a sejtcsapdázás egyik legelterjedtebb módja a mikrofluidikai rendszerekben, mivel egyszerű és nagy áteresztőképességű. Továbbá nagy előnye, hogy a sejteket szabadon lehet engedni a mellékcsatornában lévő áramlás megfordításával. A hidrodinamikai csapdázás többféle módszerrel is megvalósítható, például membránokkal, mikrostruktúrákkal és mikrokonténer mátrixokkal[138–140]. A mikrostruktúrák létrehozásához PDMS használata gyakori eljárás, például strukturált oszlopok segítségével a sejtek a mélyedésekben csapdázhatóak (17.B ábra)[139].

A mikrokonténer mátrixok apró, szabályos méretű mélyedések, melyek szilárd felületen rendezetten helyezkednek el a mikrochipek felületén. A mikrokonténerek átmérőjének és mélységének a vizsgálandó sejtek méretéhez történő illesztésével rendkívül nagy hatékonyságú csapdázás érhető el (17.C ábra)[140].



17. ábra. (A) A hidrodinamikai csapdázás általános módszere,[141] (B) mikrostruktúrák alkalmazása a csatornákban[139] és (C) sejtcsapdázás PDMS mikrokonténer mátrixban[140].

4.8.2. Dielektroforézis

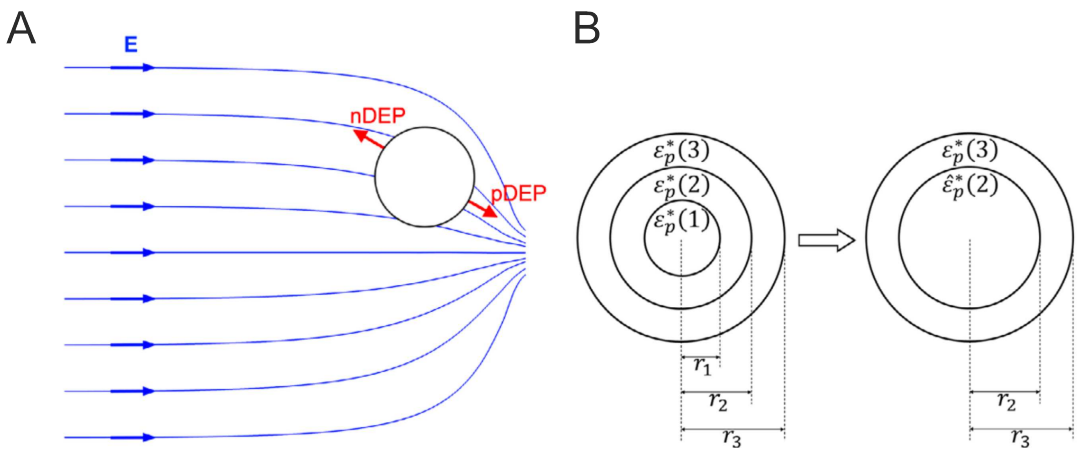
A dielektroforézis egy aktív, kontaktusmentes módszer, mely során az inhomogén elektromos térben található dielektrikumok a tér hatására elmozdulnak. A részecskék polarizációja függ azok fizikai tulajdonságaitól (permittivitás, dielektromos állandó, vezetőképesség), valamint a közeg elektromos tulajdonságaitól[133]. Ha a dielektrikum permittivitása eltér az őt körülvevő közegtől, a változó elektromos tér hatására fellépő erő:

$$\mathbf{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 Re[K(\omega)]\nabla\mathbf{E}^2_{rms}, \tag{16}$$

ahol r a dielektrikum sugara, E_{rms} az elektromos tér négyzetes középértéke a dielektrikumnál, ϵ_m a közeg permittivitása, $K(\omega)$ a Clausius-Mossotti faktor, mely frekvenciafüggő, a dielektrikum és a közeg komplex permittivitásaiból a következőképpen számolható:

$$K(\omega) = \frac{\epsilon^*_p - \epsilon^*_m}{\epsilon^*_p + 2\epsilon^*_m} \tag{17}$$

A dielektromos erő pozitív vagy negatív irányultsága függ a Clausius-Mossotti faktor előjelétől. Pozitív erő hatására a dielektrikum a nagyobb elektromos mező felé mozdul el (p-DEP), negatív erő esetén pedig a kisebb felé (n-DEP) (18.A ábra). A módszer alkalmazásával az életképes és nem életképes sejtek elkülöníthetőek egymástól[142]. Az életképes és nem életképes sejtek különböző Clausius-Mossotti faktora miatt az életképeseket a pozitív erő, a nem életképeseket pedig a negatív erő téríti el. Emiatt eltérő helyeken gyűlnek össze, így életképesség szerint szétválaszthatóvá válnak.



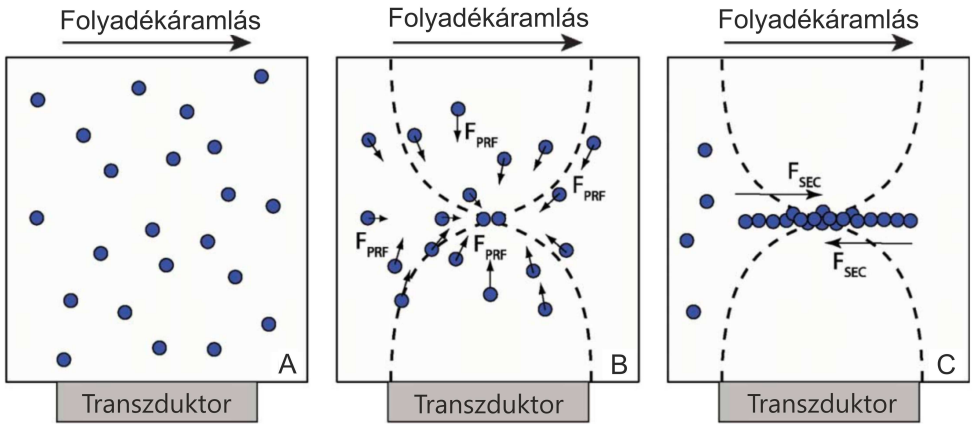
18. ábra. (A) A dielektroforézis sematikus ábrázolása és (B) a multihéj modell, mely a sejtek részenként eltérő dielektromos tulajdonságait ábrázolja[133].

A sejtek külső elektromos térre adott válasza a sejten belül található ionoktól és töltött molekuláktól függ, melyek a membránpotenciál kialakításáért is felelősek. Az elektródák között alkalmazott elektromos feszültség nagyságának és frekvenciájának megfelelő kombinációjával a sejtek csapdázása megvalósítható.[143]. A sejtek dielektromos tulajdonságai különböző részeik és dielektromos jellemzőik segítségével írhatóak le, mint például a citoplazma ($\epsilon_p^*(1)$), a sejtmembrán ($\epsilon_p^*(2)$) és a sejtfal ($\epsilon_p^*(3)$) (18.B ábra). Ezek segítségével meghatározhatóak a sejt egészére vonatkozó dielektromos jellemzők.

4.8.3. Akusztoforézis

Az akusztoforézis egy aktív, kontaktusmentes módszer, mely során álló ultrahanghullám segítségével sejtek vagy mikrorészecskék csapdázhatóak. A módszer alapja ultrahangos állóhullámok létrehozása, melyek állandó nyomásteret és gradienst alakítanak ki a csatornában. Amennyiben a részecske sűrűsége és kompresszibilitása eltér a környező folyadékétól, a nyomásgradiens hatására erő hat rá. Ez lehet elsődleges sugárzási erő ($\mathbf{F}_{PRF}$) vagy a részecskék között ható másodlagos erő ($\mathbf{F}_{SEC}$). Ezek közül a tengelyirányú elsődleges sugárzási erő dominál, mely a részecskéket az állóhullám nódusának tengelyére gyűjti össze. A fellépő laterális erők ($\mathbf{F}_{LAT}$) a nódus központi tengelye felé irányítják a részecskéket, míg a másodlagos erők a részecskék csoportosulását okozzák. Az említett erők és hatásaik a 19. ábrán láthatóak.

Az állóhullámok keltésére általában interdigitális transzducereket alkalmaznak, melyek geometriájának változtatásával az akusztikus tér eloszlása is szabályozható. A kialakuló hullám rezonanciafrekvenciája az elektródák közötti távolsággal pontosan beállítható. A dielektroforéziséhez hasonlóan a sejtekre ható akusztikus erő vonzó vagy taszító lehet, attól függően, hogy a sejt anyagi tulajdonságai, például sűrűsége és kompresszibilitása hogyan viszonyulnak a környező közeghez[136,144].



19. ábra. A részecskékre ható erők és hatásaik az akusztofluidikai struktúrákban[145]

4.8.4. Magnetoforézis

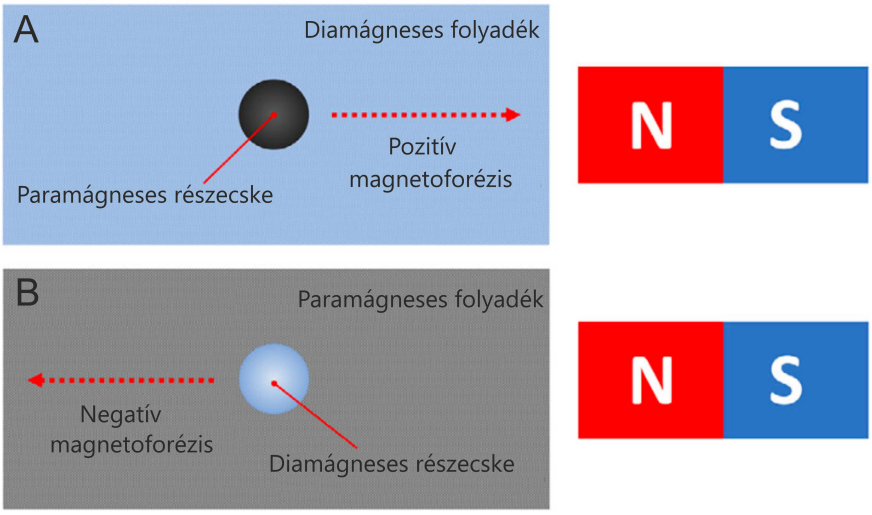
A magnetoforézis szintén aktív, kontaktusmentes technika, mely során a részecskék mozgatása vagy rendezése mágneses manipulációval, állandó mágnesek vagy elektromágnesek használatával valósul meg. A részecskére ható mágneses erő a következőképpen adható meg:

$$\mathbf{F} = \frac{V \cdot \Delta\chi}{\mu_0}(B \cdot \nabla)\mathbf{B}, \tag{18}$$

ahol V a részecske térfogata, $\Delta\chi$ a közeg és a részecske szuszceptibilitásának különbsége, és $\mathbf{B}$ a mágneses térerősség. Homogén mágneses térben nem hat eredő erő a részecskére, míg inhomogén mágneses térben a gradiens következtében erő lép fel, mely lehetővé teszi különböző méretű és anyagú mágneses részecskék csapdázását. A részecskékre ható erő tipikusan pN-os nagyságrendbe esik[146].

A mikrorészecskék vagy sejtek környező folyadékhoz viszonyított mozgékonysága a 18. egyenlet alapján két fő tényezőtől függ: a mágneses szuszceptibilitás különbségétől ($\Delta\chi$) a részecske és a közeg között, valamint a mágneses tér gradiensétől ($\nabla\mathbf{B}$). Ennek következtében a sejtek csapdázása, fókuszálása vagy szétválasztása két alapvető módszerre bontható: pozitív és negatív magnetoforézisre (20. ábra).

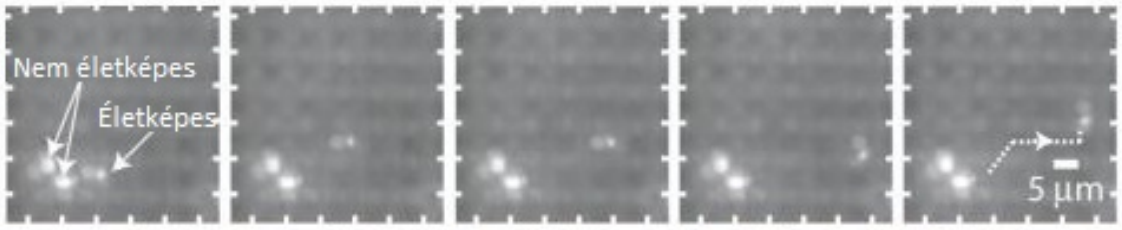
Pozitív magnetoforézis esetén a mágneses mikrorészecskék diamagneses közegben találhatóak. Ilyenkor a részecskék mágneses szuszceptibilitása nagyobb, mint a közegé, ezért a külső mágneses tér hatására a mágneses tér maximumai felé mozdulnak el. Ez a módszer alkalmazható mágneses mikrorészecskék manipulálására vagy eredendően mágneses tulajdonságú biológiai objektumok kezelésére, mint például a vörösvértestek, melyek hemoglobinja gyengén paramágneses. A diamágneses sejtek pozitív magnetoforéziséhez a sejtek mágneses tulajdonságait mágneses nanorészecskékkel történő felületi módosítással lehet megváltoztatni.



20. ábra. (A) Pozitív és (B) negatív magnetoforézis sematikus ábrája[147]

Negatív magnetoforézissorán a diamagneses részecskék mágneses közegben, például paramágneses oldatban vannak szuszpendálva. Ekkor a környezet mágneses szuszceptibilitása nagyobb, mint a részecskéké, ezért azok a mágneses tér minimumai felé mozognak[135].

A sejtek általában természetüknél fogva nem rendelkeznek számottevő paramágneses vagy diamágneses tulajdonságokkal, így a magnetoforézisükhöz szükség van valamilyen mágneses jelölésre. Ez általában felszínmódosított nanomágneses gyöngyökkel és ellenanyag–antigén kölcsönhatás segítségével történik, mely során a részecskék a sejtfelszínhez kötődnek. Mikrofluidikai rendszerben elhelyezett komplex mágneses mintázat vagy több mágneses pólus segítségével lehetséges a részecskék forgatása és mozgatása, valamint az életképes és nem életképes sejtek szétválaszthatóak (21. ábra)[148].



21. ábra. Életképes és nem életképes élesztősejtek szétválasztása magnetoforézis segítségével[148]

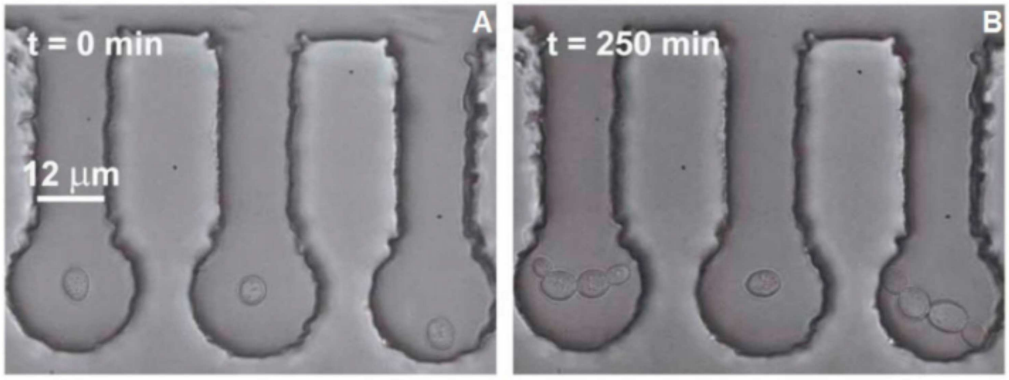
4.8.5. Optikai csipesz

Az optikai csipesz hatékony eljárás a sejtek és részecskék csapdázására. A módszer egy fókuszált lézernyalábot alkalmaz, mely egy, a közegnél nagyobb törésmutatójú objektumot a nyaláb közepe felé képes téríteni. A monokromatikus lézerfényen alapuló csipeszek nm-es és µm-es mérettartományban képesek részecskéket manipulálni, így alkalmasak biológiai sejtek kezelésére is. A robot-asszisztált optikai csipeszek lehetővé tették a sejtek automatizált, többdimenziós manipulációját, ezért alkalmazhatóak a sejtmechanika, sejtszállítás és sejtmigráció vizsgálataiban. Az optikai csipeszek alkalmasak statikus környezetben történő sejmanipulációra, mikrofluidikai chipekkel kombinálva pedig folyamatos áramlás alatt is működtethetőek, például sejtek szeparálására[134].

Az optikai manipuláció alapja a részecskék lézerfénnyel történő megvilágítása, mely során a részecske fényszórása a fotonok lendületének megváltozásához vezet, így kialakul az optikai erő. Az optikai csapdázás a fény–anyag kölcsönhatások kihasználásán alapul, kétféle erő megkülönböztetésével: a gradiens-erő, mely a részecskét a lézernyaláb fókuszpontja felé húzza, és a szórási erő, mely a lézer terjedési irányába tolja. Több tényező, mint például a Stokes-féle közegellenállási erő vagy a Brown-mozgás, szintén hozzájárul a csapda stabilitásához. Az optikai csipeszek akár 0,1 nm-es elmozdulásokat is képesek vizsgálni, és atto– illetve pico-Newton tartományú erőket hoznak létre.

A részecskék tipikusan két ellentétes irányból érkező, összetartó lézernyaláb által létrejövő erőegyensúly révén csapdázhatóak[149].

Az optikai csipeszek előnyei a nagy pontosság, a nem-invazív működés és az egysejt-manipuláció. A sejtekre ható lézererő kis nagyságrendje miatt nagy áramlási sebességnél a csipesz nem képes hatékonyan eltéríteni a sejteket. További hátrányai az optikai rendszer bonyolultsága és költségessége.



22. ábra. Optiaki csipesszel csapdázott élesztősejtek[134]

5. Célkitűzés

Kutatómunkám célja olyan mikrofluidikai rendszerek kialakítása, melyek az optikai vizsgálatok helyett elektromos mérési módszereket alkalmaznak, mivel az optikai módszerekben általánosan használt fluoreszcens festékek befolyásolhatják a sejtek működését, megváltoztathatják viselkedésüket, és toxikusak is lehetnek. A sejtek egyéb befolyás nélküli válaszának követésére alkalmas módszer az impedancia spektroszkópia, mely számos kémiai és sejtanalitikai módszer alapja. Célom ennek a módszernek a mikrofluidikai rendszerbe történő integrálása, mely non-invazív és jelölésmentes mérési módszert valósít meg a struktúrán belül.

A sejtek és sejtkultúrák elemzése során fontos szempont a vizsgálandó hatóanyagok és terápiás szerek koncentrációjának és eloszlásának pontos nyomon követése. A munkám kezdetén elsődleges célom a mikrofluidikai struktúrákba juttatott hatóanyagok eloszlásának tervezése, vizsgálata, illetve követésének megvalósítása volt. Ehhez a kémiai gradiens kontrollált kialakulását vizsgáltam az erre a célra tervezett mikrofluidikai rendszerben. Elemeztem a fluoreszcens fehérjék diffúzióját a kialakított csatornákban, így modellezve a csatornába bejuttatott hatóanyagok terjedését. Egyúttal az általam fejlesztett programkód segítségével vizualizálhatóvá tettem a diffúziós mechanizmust.

A fejlesztés következő szakaszában célom a sejtcsapdázás mikrofluidikában történő megvalósítása volt, mely elengedhetetlen a sejtek tulajdonságainak lokális tanulmányozásához. Ehhez a célnak megfelelően módosított mikrocsatornákban sejtcsapdázási módszereket teszteltem, először vertikálisan szűkülő csatornák, majd egy, a csatornában elhelyezett mikroméretű gát alkalmazásával.

A sejtek életképességének nyomon követésének kidolgozása szerves részét képezte a munkámnak, ugyanis a különböző hatóanyagok hatásmechanizmusának követése esetén fontos a sejtek viabilitásának monitorozása. A csapdázott sejtek elektromos vizsgálatához célom egy olyan elektródarendszer kialakítása volt, mely alkalmas EIS mérések elvégzésére a mikrocsatornákban. A viabilitás párhuzamos optikai és elektromos vizsgálatához olyan nyáklapot alkalmaztam, mely integrált mikrofluidikai struktúra segítségével egyszerre valósítja meg a fluoreszcens jelek megfigyelését és az impedancia spektrumok felvételét. Ezen fejlesztési szakaszban történt az elektródák integrálása és funkcionális validációja is.

A kutatás ezen szakasza során az alkalmazott rendszerek fejlesztése két irányba ágazott. Az egyik a sejtpopulációk vizsgálata EIS-sel, ahol az elektródák között csapdázott sejtek vizsgálata került előtérbe. A másik irány pedig a mikrofluidikában megvalósított elektromos impedancia tomográfia, melynek során a csatornában kialakuló laterális sejteloszlásról szeretnénk képet kapni elektromos leképezés segítségével. Az impendancia tomográfia mikrofluidikában történő megvalósítására először az ÚNKP, majd az EKÖP pályázatot is elnyertem.

Az elektromos vizsgálatokat két- és négy-elektródás mérési módszerekkel végeztem, melyek kivitelezéséhez együttműködtem a Pécsi Tudományegyetem kutatóival, akik jóvoltából a négy-elektródás mérések elvégzésére egy általuk fejlesztett bioimpedancia mérőműszer használatára volt lehetőségem.

A kutatás során a rendszer működőképességének igazolására (proof-of-concept) modell sejtekként élesztőgombákat használtam (*S. cerevisiae*), mivel ezekkel lényegesen egyszerűbb és biztonságosabb dolgozni, mint magasabb rendű vagy humán sejtekkel. A HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetének Mikrorendszerek Laboratóriumában a humán rákos sejtek beszerzése és fenntartása nem volt gyakorlatban. A sejtes munkákban a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoportjának együttműködése és segítsége elengedhetetlen volt. Közreműködésükkel lehetőségem nyílt a létrehozott chipek tesztelésére humán méhnyakráksejtekkel is. A kutatásom során végrehajtott fejlesztések révén lehetővé válik a mikrofluidikai rendszerek laboratóriumi vizsgálata és tesztelése humán sejtvonalakon is. Ez bővíti a labor profilját, és elősegíti az elmozdulást a LoC rendszerektől a jelenleg intenzíven kutatott OoC rendszerek fejlesztése és vizsgálata felé. A kutatásom során tett lépéseimnek köszönhetően megvalósítható a laboratóriumban a mikrofiziológiai rendszerek vizsgálata és tesztelése humán sejtvonalak esetén is, mely szélesíti a labor profilját, elmozdulva a LoC rendszerek irányából a ma intenzívebben kutatott OoC rendszerek létrehozása és kutatása felé.

6. Technológiai ismertető

6.1. Gyártástechnológia

6.1.1. Mikrofluidikai struktúrák jellemző anyaga

A mikrofluidikai chipek legfőbb jellemzőit és előállítási technológiáit a mikrofluidika tervezett és választott anyaga határozza meg. A mikromechanikai megoldásoknak köszönhetően a félvezetőiparban jól ismert technológiák állnak rendelkezésre a szilícium és az üveg megmunkálására, viszont ezek bonyolult és drága folyamatok. A szilícium esetén további komoly korlátot jelent, hogy látható fényre nem átlátszó, így a mikrochipben történő folyamatok nem követhetőek egy egyszerű fénymikroszkóp segítségével. A különböző polimerek ezáltal egyre inkább teret nyernek a mikrofluidikai rendszerek kialakításánál preferált anyagokként, mivel előállításuk költséghatékony, összetételük jól szabályozható, és tömeggyártásra is alkalmasak. A laboratóriumi gyakorlat során a két leggyakrabban használt polimer a polidimetil-sziloxán (PDMS) és egy negatív, epoxi alapú fotoreziszt, az SU-8.

A PDMS egy sziloxán alapú, biokompatibilis elasztomer, mely kétkomponensű (alap és térhálósító ágens) rendszerként, vinil–hidrogén-sziloxán reakción keresztül, platina katalízisével térhálósodik. A komponensek arányának megválasztásával az elasztomer rugalmassága szabályozható; általánosan az alap és az ágens 10:1 arányát alkalmazzák. A reakció szobahőmérsékleten külön hőkezelés nélkül is végbemegy, azonban hőkezeléssel a polimerizáció felgyorsítható.

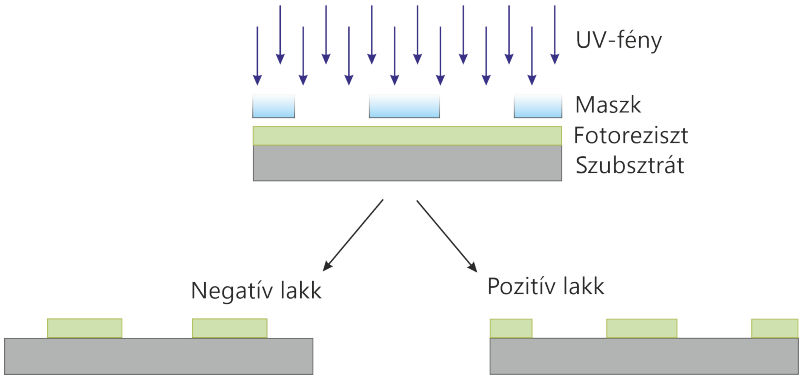
Az említett eljárás egy rugalmas és stabil szerkezetű polimert eredményez, mely számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a mikrofluidikai alkalmazások tekintetében, például optikailag átlátszó, inert, gázáteresztő, biokompatibilis és könnyen mintázható. Ezen tulajdonságai miatt rendkívül jól alkalmazható a mikroszerkezetek lágy litográfiás gyártásában és a komplex mikrocsatornák kialakításában[150]. Hátrányt jelent viszont a kisebb molekulák, például gyógyszermolekulák, oldószerek és fehérjék adszorpciója, melyet bizonyos felületkezelési technikák mérsékelhetnek[151]. Ezen felül a PDMS eredendően hidrofób, mely plazmás felületkezeléssel vagy az elasztomer egyéb vegyületekkel való módosításával kiküszöbölhető, például polietilén-oxid (PEO) alkalmazásával[152,153].

A PDMS csatornák hidrofilizálására használt oxigénplazmás kezelés alkalmazható a struktúra szivárgásmentes lezárására is, mely irreverzibilis kovalens kötést alakít ki a csatorna (pl. üveg) ellendarabjával. A kezelés szilanolcsoportokat (Si–OH) hoz létre a PDMS felszínén a metilcsoportok oxidációján keresztül. Az oxidált PDMS ezután képes kötést kialakítani saját magával, üveggel, szilíciummal, polisztirollal, polietilénnel vagy szilícium-nitriddel, feltéve, hogy ezek a felületek szintén átestek a plazmás kezelésen.

A PDMS viszont csak rövid ideig marad hidrofil, illetve az oxidált felszín szabad levegőn gyorsan visszarendeződik, így a felületek illesztése a kezelést követő pár percben történik. A két felület közötti kovalens kötés alacsony hőmérsékletű hőkezeléssel javítható.[150]

A SU-8 egy nagy molekulatömegű, epoxi alapú, biokompatibilis negatív fotoreziszt, melyet az IBM fejlesztett és szabadalmaztatott 1989-ben. Ez a fotoreziszt a mikroelektromechanikai rendszerek (MEMS) gyártásában széleskörben alkalmazott anyag, különösen mikrofluidikai csatornák, nagy oldalarányú (high aspect ratio) struktúrák és MEMS eszközök készítéséhez[154,155]. A SU-8 különlegessége, hogy UV-fény hatására térhálósodik, így a megvilágított területek kémiailag stabil és mechanikailag erős struktúrává alakulnak. A fény hatására térhálósodó lakkokat negatív lakkoknak nevezzük, a pozitív lakkok pedig azok, melyek megvilágítás hatására kioldhatóvá válnak (23. ábra).

A SU-8 alkalmas akár több tíz vagy száz mikrométer magas, meredek oldalfalú minták gyártására a viszkozitásának oldószerrel való hangolhatóságának köszönhetően. Előnye az alacsony belső feszültség, a kitűnő kémiai ellenállás, valamint a különböző szubsztrátokon, például szilíciumon, üvegen vagy fémoxidokon való remek tapadása. Leggyakrabban a lágylitográfiás eljárásokhoz használt öntőformák készítésére alkalmazzák, ahol a kialakított SU-8 szerkezet szolgál sablonként a PDMS öntéséhez. Hátránya, hogy a térhálósodást követően nehezen távolítható el a szubsztrátról, továbbá érzékeny az UV-expozíció és a hőkezelés paramétereire, mely repedésekhez vagy tapadási problémákhoz vezethet.

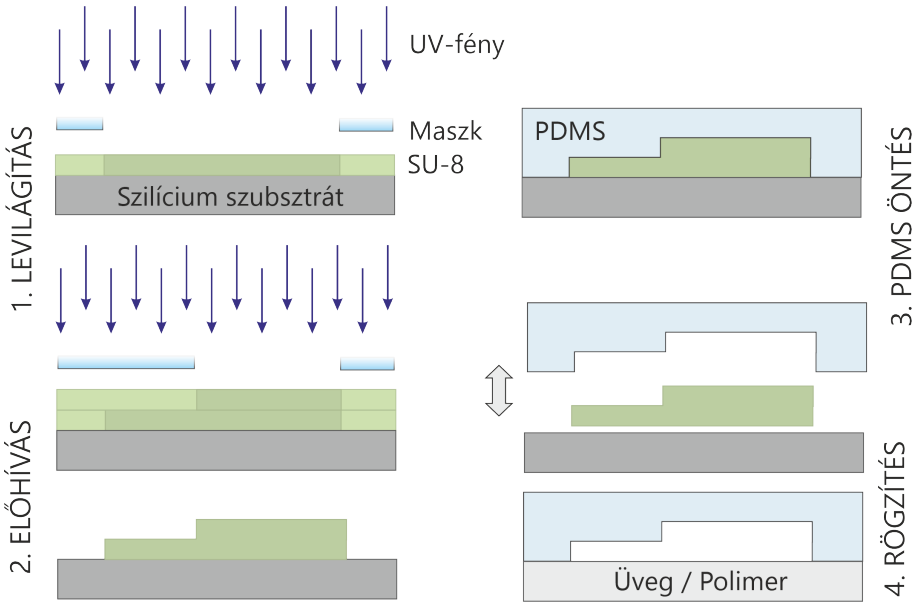


23. ábra. A pozitív és negatív lakk közötti különbség

6.1.2. Mikrofluidikai struktúrák kialakítása lágy litográfiával

A mikrofluidikai chipek előállításának leggyakoribb módja - laboratóriumi szinten - a lágy litográfia. Ennek lépéseit az 24. ábra mutatja. A hordozó dehidratálása (300 $^{\circ}C$) után az első lépés a SU-8 hordozóra történő felvitele, melyet a kiválasztott, megfelelő viszkozitású SU-8 fotoreziszt felcentrifugálásával (Brewer Science Cee 200CBX spin-bake system) érhetünk el. A centrifugálás sebességével és az oldat viszkozitásának megfelelő megválasztásával a kialakítandó réteg vastagsága bizonyos tartományban hangolható.

A lakkréteg ezután az előírt, megfelelő szárítási és relaxációs lépéseken megy át, majd az optikai litográfia következik, mely során a fotoreziszt polimerizációja UV-fény hatására történik a kívánt, előre definiált helyeken. A mintázat meghatározásához maszküveget használunk, mely a kívánt helyeken átengedi a fényt. A maszküveg króm réteggel bevont, kiváló minőségű plánparallel üveglemez, melyet lézeres direkt litográfiával (Heidelberg DWL66 lézeres ábragenerátor) és nedves marással megmunkálva kialakul a legenerálandó ábra. A mikrostruktúrákat meghatározó litográfiai ábra szilicium szeleten történő megfelelő kialakításához maszkillesztő berendezést alkalmazunk (Süss MicroTech MA6), mely segítségével beállítható az egyes rétegvastagságokhoz tartozó expozíciós idő és energia. A pontos illesztés változó magasságú mikrofluidikai struktúra kialakításánál rendkívül fontos, például különböző vastagságú rétegek egymáson történő kialakítása, illetve a fém elektródák pontos integrációja esetén. Ilyen esetekben a szeleteken létrehozott és a maszklemezeken található illesztőjeleket használjuk a rétegek egymáshoz való illesztéséhez. A megvilágított réteg további hőkezelési és relaxációs lépéseken megy át, attól függően, hogy hány lépéses az előállítási folyamat. A rétegek külön-külön, vagy akár együttes előhívása a használt fotorezisztnek megfelelő oldószerben történik, mely során a nem polimerizálódott részek eltávolíthatóak. A SU-8 negatív tónusú fotoreziszt a megvilágítás hatására keresztkötéseket alakít ki és polimerizálódik, ami így a struktúra negatív öntőformáját adja, mely a következő lépésben PDMS-sel kerül feltöltésre. A még folyékony PDMS-ben található gázbuborékok egy vákumszivattyú segítségével eltüntethetőek. A kiöntött réteg megszilárdulása után a polimer eltávolításával létrejön a mikrochip, mely tartalmazza a kívánt csatornákat és struktúrákat. Ezt követően a PDMS lezárása oxigénplazmával aktivált kötés (bondolás) révén valósítható meg, szilíciumalapú szubsztrát esetén (Si, üveg)[156].



24. ábra. Mikrofluidikai chip előállításának módszere lágy litográfiával[157]

6.2. Vékonyrétegek előállítása

6.2.1. Vákuumporlasztás

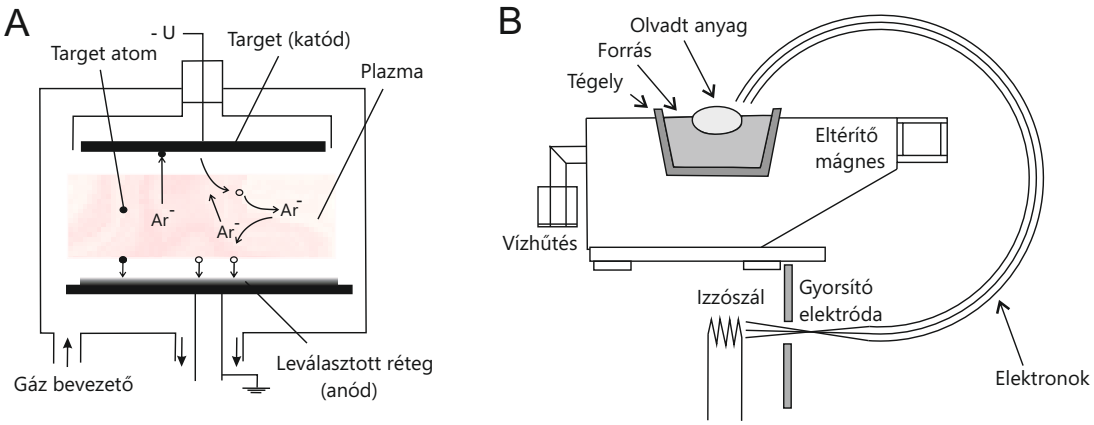
A vákuumporlasztás a vékonyréteg előállítási technikákon belül a fizikai leválasztásokhoz tartozó módszer, mely során ritkított gáztérben, két elektróda által generált plazma segítségével töltött részecskék létrehozása a cél, melyek alkalmasak a target anyagának porlasztására. A folyamat során a vákuumtérben található elektronok felgyorsulnak, majd ütköznek a kamrában található nemesgázionokkal, melyekről további elektronokat szakítanak le. A létrejött pozitív ionok a katódba csapódnak, ahonnan atomokat löknek ki, melyek az anódon levő hordozón válnak le, létrehozva a tervezett vékonyréteget (25.A ábra). A módszer egyaránt alkalmas szigetelők és vezetők porlasztására. Szigetelők esetében rádiófrekvenciás porlasztást alkalmaznak, mivel egyenfeszültség alkalmazása esetén az anyag elektromos feltöltődése csökkentené a porlasztási rátát. További, speciális porlasztási módszer a reaktív porlasztás, mely során a target anyagából kiszakított atomok és molekulák a gáztérbe vezetett reakciógázzal további reakció során módosulhatnak, így a hordozó felszínén vegyületet képeznek a target anyagának atomjaival.

6.2.2. Vákuumpárologtatás

A vákuumpárologtatás szintén a fizikai leválasztásokhoz tartozó módszer, mely során a leválasztani kívánt anyag ritkított térben történő gőzfázisba hozásával az a hordozó felületén kondenzálódik, így vékonyréteget képez annak felületén. A párolgási hőmérséklet direkt fűtéssel, elektronnyalábos vagy lézeseres fűtéssel érhető el.

Ellenállásfűtéses gőzölés során a gőzölni kívánt anyag egy úgynevezett csónakban van elhelyezve, melynek melegítése ellenállásfűtés segítségével történik. A csónakban található anyag a hevítés hatására megolvad, majd eléri a megfelelő gőznyomást. Ez a módszer számos anyag párologtatására alkalmas, viszont szabályozása elég nehéz, a csónak anyaga szennyezést okozhat, ezenfelül magas olvadáspontú anyagok párologtatására nem használható. A csónak anyagát a gőzölendő anyag függvényében választják meg, úgy, hogy elkerülhető legyen a csónak és a gőzölendő anyag közötti kémiai kölcsönhatás. A csónak általában wolframból vagy molibdénből készül, melyek magas olvadásponttal rendelkeznek.

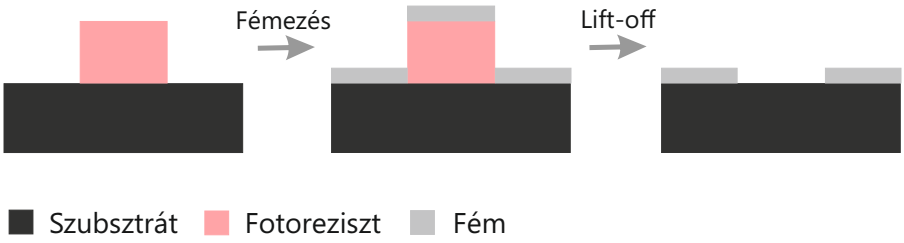
Elektronsugaras gőzölés során az elektromos mező hatására a katódból kilépő elektronokat a térre merőleges mágneses térrel $230-270°$-al eltérítik, mely során azok körpályára kerülnek (25.B ábra). A gőzölendő anyag az eltérített elektronok pályáján elhelyezkedő vízhűtött tégelyben található. Az elektronok becsapódásával és rugalmatlan ütközésével átadott energia következtében az anyag megolvad. A módszer előnye az ellenállásfűtéssel szemben, hogy magasabb olvadáspontú anyagok gőzölése is lehetséges, könnyen és gyorsan szabályozható és elkerülhető a csónak által okozott szennyezés, viszont az elektronok fékeződésük miatt röntgensugárzást keltenek.



25. ábra. (A) A katódporlasztás és (B) az elektronsugaras gőzölés sematikus ábrája

6.3. Lift-off litográfia

A lift-off litográfia egy vékonyréteg-technológiában alkalmazott mintázási eljárás, mely fizikai leválasztáson alapuló, kombinált technológiai lépésekből áll. Célja fém- és dielektrikumrétegek pontos kialakítása. A módszer során a szubsztráton fotoreziszt réteg segítségével mintázat alakítható ki, mely tartalmazza a leválasztani kívánt struktúra negatív formáját. Ezt követően fizikai leválasztás segítségével megtörténik a kívánt anyag felvitele. A fotoreziszt acetonnal történő eltávolítása során a rajta elhelyezkedő réteg leválik a szubsztrátról, míg a kívánt mintázat a hordozó felületén marad. A lift-off litográfia különösen hasznos nehezen marható anyagokban (arany, platina) történő mintakialakításra, melyet előszeretettel alkalmaznak mikroelektródák vagy fűtőtestek, hőmérők kialakítására.



26. ábra. A lift-off litográfia lépései

6.4. Anyagvizsgálati és nanomegmunkálási módszerek

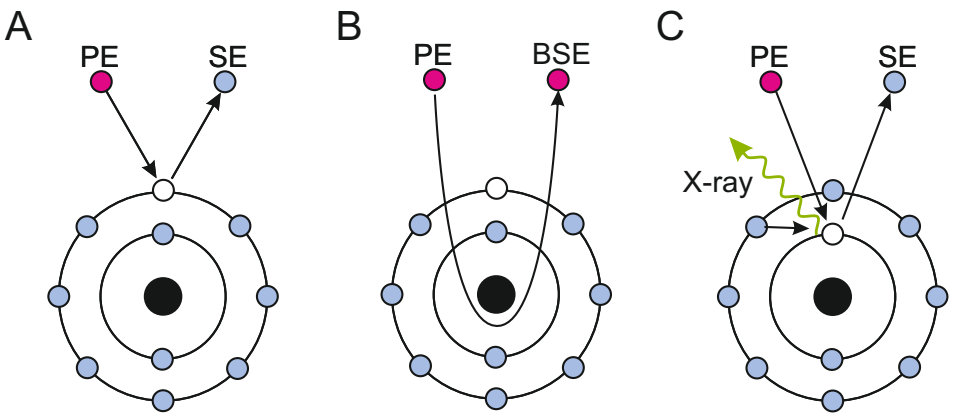
6.4.1. Pásztázó elektronmikroszkóp

A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) kifejlesztésének motivációja az optikai képkészítés felbontásának javításából származik, melyet nagy mértékben korlátoz az alkalmazott fénysugár hullámhossza. Az Abbe-féle limit szerint a legkisebb felbontható távolság (d) arányos a fény hullámhosszának (λ) felével és a numerikus apertúrával (NA), így $d = \lambda/2\text{NA}$. A fény látható hullámhosszai esetén ($\lambda = 400 - 700$ nm) a felbontás körülbelül 0.2 μm. Elektronok alkalmazásával, a felbontás növelhető, mivel az elektronok de Broglie hullámhossza $\lambda = h/\sqrt{2meV_0}$, ahol m az elektron tömege, e az elektron töltése és V_0 a gyorsítófeszültség.

A SEM elektronsugarának létrehozásához elektronágyút alkalmaznak, mely alacsony kilépési munkával rendelkező fém szál termikus emisszióján vagy hegyes csúcs téremisszióján alapul. Az elektronok megfelelő energiára történő gyorsítása a katód és az anód között beállított gyorsító feszültség segítségével történik. A sugár mágneses kondenzorlencséken és apertúrákon halad keresztül, majd mágneses objektívlencsék qhlsegítségével fókuszálódik a minta felszínére, miközben pásztázótekercsek gondoskodnak a sugár felület menti letapogatásáról. A SEM működéséhez nagy vákuum szükséges az elektronok szóródásának elkerülése és a megfelelő szabad úthossz biztosítása érdekében. Ennek köszönhetően az elektronok a kívánt energiával érik el a felszínt, ahol szekunder elektronokat hoznak létre vagy visszaszóródnak.

A szigetelő mintafelületen az elektronsugár hatására töltésfelhalmozódás jön létre. Ez módosítja a szekunder- és visszaszórt elektronok emisszióját, valamint eltérítheti a primer elektronsugarat. Ennek elkerülése érdekében nagyobb elektronenergiák esetén vezető felület szükséges, ezért a szigetelő mintákat vékony arany- vagy szénréteggel vonják be.

Az elektronsugár és a minta atomjainak kölcsönhatásából különböző mechanizmusok segítségével különböző jelek detektálhatóak, melyek a minta felületének különböző mélységéből származnak. A leggyakrabban használt jelek a 27. ábrán láthatóak. A szekunder elektronok (SE) akkor jönnek létre, amikor az elektronsugár a minta atomjainak elektronhéjairól lök ki gyengén kötött elektronokat. Ez a jel rendkívül felületérzékeny, a felszín 1-10 nm vastag rétegéből nyújt információt. A visszaszórt elektronok a mintával rugalmasan ütköznek, majd elhagyják a minta felszínét. Ez a jel érzékeny a domborzatra, a rendszámra és a kristályorientációra. Karakterisztikus röntgensugárzás akkor jön létre, amikor az elektronsugár a minta belső elektronhéjairól lök ki elektronokat és ezek helyét külső elektronok töltik be. Az energiakülönbség karakterisztikus röntgensugárzás (X-ray) formájában hagyja el a mintát. Az energiadiszperzív röntgenspektroszkópia (EDS) ezen röntgensugarak gyűjtésén alapszik, segítségével meghatározható a minta anyagösszetétele, mivel a felvett spekturmból az elemekre jellemző röntgenvonalak azonosíthatóak.



27. ábra. A primer elektronsugár (PE) által gerjesztett jelek sorrendben: (A) szekunder elektronok (SE), (B) visszaszórt elektronok (BSE) és (C) karakterisztikus röntgensugárzás

6.4.2. Fókuszált ionsugaras marás

A fókuszált ionsugaras marás (FIB) technika hasonlóan működik, mint a pásztázó elektronmikroszkóp, viszont a képalkotás, illetve a felület módosítása elektronok helyett fókuszált ionsugárral történik. Az ionsugár létrehozásához leggyakrabban gallium-ionokat használnak.

A FIB technikának alapvetően három alkalmazása van: képalkotás (alacsony ionáram), felület porlasztása (magas ionáram), illetve anyagok leválasztása a minta felületére. A Ga ion sugár eltalálja a minta felszínét, ahonnan anyagot távolít el másodlagos ionok, semleges atomok vagy másodlagos elektronok formájában, melyek detektálásával történik a képalkotás. Az anyagok leválasztása prekurzor gáz felületre juttatása mellett történik, mely az ionnyaláb hatására elbomlik, így a kívánt anyag leválik a felületre.

A berendezés működése Ga ionok gyorsításán alapszik. A forrás kulcsalkatrésze egy fémtű, amit a folyékony Ga megnedvesít és az arra kapcsolt feszültség ionizálja a tű végén lévő atomokat, ezáltal létrehozza az ionáramot. A gyorsítófeszültség értéke 2 – 30 kV között változhat, az ionáram pedig néhány pA-től a nA-es tartományon változhat. Alacsony ionárammal nagyobb felbontást lehet elérni, míg a nagy ionáram gyorsabb porlasztást eredményez. A gyakorlatban gyakran használnak kétsugaras gépeket, melyekben FIB és SEM is található. A SEM-et képalkotásra használják, mivel ez nem károsítja a felületet, a FIB-et pedig nanométeres felbontású megmunkálásra.

7. Kísérleti anyagok és módszerek

7.1. Lágy litográfia

A munkám során készült mikrofluidikai chipek geometriai elrendezését a CleWin5 és CleWin6 (WieWeb szoftver[2]) alaprajztervező szoftver segítségével rajzoltam. A tervezett mikrofluidikai chipek gyártása során minden lépés vagy 10-es, vagy 1000-es tisztaságú (ISO2 - ISO4) tisztatérben történt. A chipek standard lágy-litográfiás eljárással, PDMS-ben készültek, replikamintázás alkalmazásával[10].

A laborban általánosan használt mesterforma 4 hüvelykes szilícium- vagy üveg szubsztráton kerül kialakításra, többlépcsős fotolitográfiával, SU-8 2010 és 2050 negatív fotorezisztek alkalmazásával, egymást követő expozíciós és előhívási lépésekben. A pozitív dombormintát, rajta a megfelelő struktúrákkal, 1:10 arányú PDMS keverékkel öntöttem ki, majd vákumos buborékoltatás után 65 $^{\circ}C$-on 2 órás hőkezeléssel elérhető a térhálósítás. A térhálósodás után a PDMS chipeket szikével vágtam ki, majd egyenként leválasztottam őket a formáról. Ezután a chipeket ultrahangos fürdőben tisztítottam: először 1-1 percig desztillált vízben, majd izopropil-alkoholban, végül ismét desztillált vízben.

A mikrofluidikai chipekhez használt PDMS a Dow által forgalmazott Sylgard 184 készlet felhasználásával készült. Az öntőformák SU-8 epoxi alapú negatív fotorezisztből készültek, melyek a Kayaku Advanced Materials-tól kerültek beszerzésre.

7.2. Elektródákkal integrált mikrofluidika

Az elektromos mérésekhez arany- és platinaelektródákat alakítottak ki 4 hüvelykes Borofloat üveg szubsztráton.

Az elektromos mérések megvalósításához arany és platina elektródák kerültek kialakításra 4 hüvelykes Borofloat üveg szubsztráton. Ez 150 nm vastag arany- és platinaréteg leválasztásával valósult meg, arany esetében vákuumpárologtatással, platina esetében vákuumporlasztással. Az elektródák tapadását 5 nm vastag titán tapadóréteg biztosítja. Az elektródák mintázatának kialakítása lift-off litográfiával történik. Az elektródák szigeteléséhez SU-8 fotoreziszt szigetelőréteget alkalmaztam, mely a megfelelő kontaktusablakok kinyitásával alkalmas a mikrofluidikán belüli mérések elvégzésére. A kész üveg szelet feldarabolását követően lehetővé válik az egyedi chipek nyomtatott huzalozású lemezre (NYÁK) való ragasztása és huzalkötése. A vákuumporlasztás egy Vaksis MiDAS 3M megnetronos porlasztóberendezéssel, a vákuumpárologtatás pedig egy AJA International ATC-M multifunkciós hibrid rétegnövesztő berendezés segítségével történt.

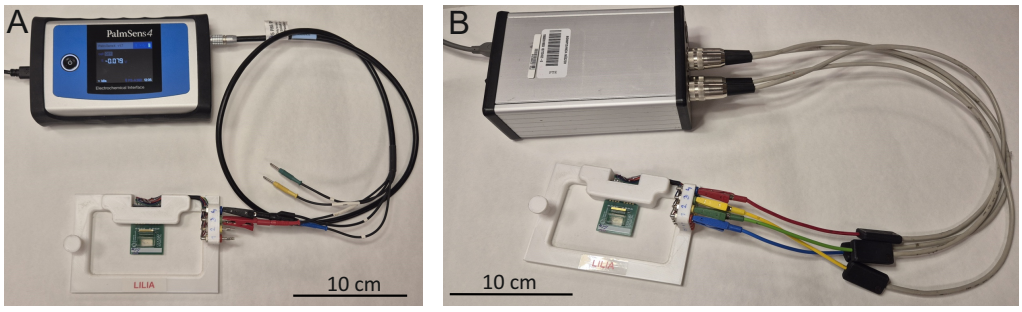
[2] https://wieweb.com/site/ (Utoljára látogatva: 2026. június 12.)

7.3. Elektromos mérések kivitelezése

Az elektromos mérések során két- és négy-elektródás mérési módszereket alkalmaztam a mikrofluidikai rendszer elektromos karakterizálásához. A két-elektródás méréseket egy PalmSens4[3]potenciosztáttal végeztem, mely képes állítható felbontással impedancia spektroszkópiai méréseket végezni a 10 µHz – 1 MHz frekvenciatartományban, mely lefedi a β karakterisztikus tartomány egy részét. A rendelkezésre álló mérőműszer maximális gerjesztési frekvenciája a fent említett tartomány felső határa, viszont a sejtes mérésekhez esetenként egy nagyságrenddel nagyobb frekvenciaértékekre lehet szükség a β tartomány teljes kihasználásához[67] Az EIS méréseket 0.2 V gerjesztőfeszültséggel mértem, ami elegendően alacsony feszültség a sejtek károsodásának elkerüléséhez.

A kísérletek során az eszközt krokodilcsipeszek segítségével kapcsoltam a mátrixhoz, a méréseket a PS Trace 5.8 szoftverrel végeztem, mely az adatok rögzítésére és kiértékelésére is szolgált. A négy-elektródás méréseket a Pécsi Tudományegyetemmel együttműködve, Vizvári Zoltán és kutatócsoportja által fejlesztett bioimpedancia mérésére alkalmas eszközzel valósítottam meg (BioEIS), mely nagyon alacsony frekvenciatartományon is pontos méréseket eredményez[158,159]. Ez a módszer növeli a mérés érzékenységét és minimalizálja a kontakt impedanciát, lehetővé téve a biológiai minták pontos elektromos tulajdonságainak vizsgálatát.[66]. A mérések rögzítése a mérőeszközhöz tartozó szoftverrel történt, az adatok feldolgozása pedig MATLAB-ban zajlott.

Az impedancia mérés megvalósításához a kollégáim közreműködésével a chip dimenzióihoz illeszkedő NYÁK-ot terveztünk. A megfelelő alkatrészek beültetésével és az elektródák megbízható kivezetésével a NYÁK alkalmassá vált a mérések elvégzésére - az üveg hordozó pontos felragasztása és az egyes elektródák huzalkötése után. A csatornák közötti váltást egy mérési mátrix segítette elő, melyet egy 3D nyomtatott mikroszkópbetétbe integráltunk. Ez beleilleszthető az általam használt fluoreszcens mikroszkópba, ezáltal segíti és megkönnyíti az elektromos mérésekkel párhuzamos optikai monitorozást.



28. ábra. A 2- és 4-elektródás mérési módszerekhez használt mérési eszközök csatlakoztatása a 3D nyomtatott mikroszkópbetétben található mátrixhoz: (A) PalmSense4 potenciosztát és (B) BioEIS eszköz esetében

[3] https://www.palmsens.com/product/palmsens4/ (Utoljára látogatva: 2026. június 12.)

7.4. Mikrobiális tenyésztés

A mikrobiális tenyésztés során a munkát egy BioBase BSC-1100IIA2-X típusú biofülkében végeztem. Ez a fülke megfelelő elszívást biztosít a sejtekkel és veszélyesebb anyagokkal való munkához, illetve a benne található UV lámpa biztosítja a megfelelő sterilitás kialakítását. A sejtek fenntartásához az inkubálást egy Esco CO_2 inkubátor segítségével végeztem.

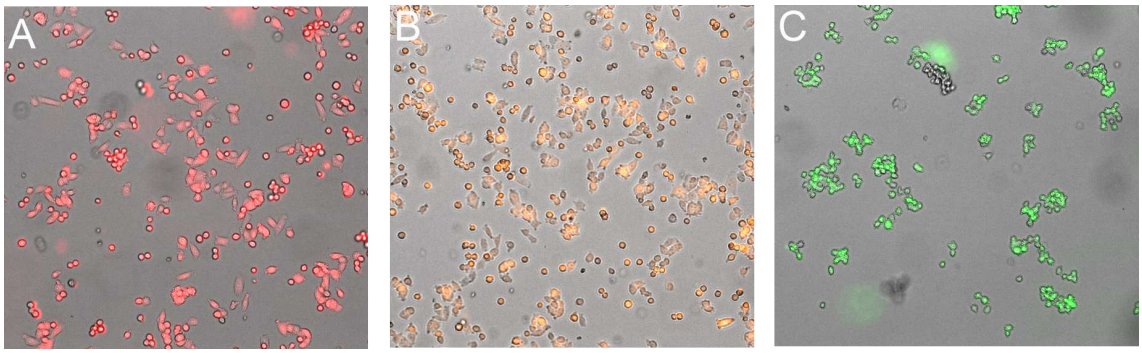
7.4.1. Élesztősejtek

A sejtes kísérletek elvégzéséhez kezdetben élesztősejteket (*S. cerevisiae*) használtam, melyeket először pH 7,4-es foszfátpufferes-sóoldatban (PBS), majd élesztő–pepton–dextróz táptalaj oldatban (YPD) tenyésztettem, 3.5 órán át $37°C$-on az inkubátorban. Az élesztősejteket, a PBS-t és az YPD-t a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be. Ezután az élesztőoldatot a kívánt (propidium jodid festésre alkalmas), gyártó által ajánlott 10^6 sejt/ml koncentrációra higítottam. Ez a koncentráció megfelelő mind a fluoreszcens festés, mind a sejtcsapdázás elvégzéséhez. A sejtek életképességét propídium-jodid festéssel ellenőriztem a Thermo Fisher által forgalmazott Propidium Iodide ReadyProbes protokollja szerint. Az ajánlott 10^6 sejt/ml koncentrációjú oldathoz 1 mL-enként két csepp reagenst adva megfelelő fluoreszcens jel érhető el. A sejtek életképességét 15 perc elteltével egy NanoEntek C-Chip 4 csatornás hemocitométerrel, fluoreszcens mikroszkóp segítségével ellenőriztem, majd az életképes sejtkultúrákkal dolgoztam tovább a mikrofluidikai eszközben. A mérések előtt és között a sejteket $37°C$-on tartottam.

7.4.2. Humán rákos sejtek

A kísérletekhez humán rákos sejtvonalakat alkalmaztam, melyeket a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoportja biztosított. A vizsgálatok a MES-SA méhnyakrákos szarkóma sejtvonalon és annak fluoreszcensen módosított variánsaiban zajlottak. A sejtek különböző fluoreszcens fehérjéket expresszáltak, melyek élő sejtekben eltérő gerjesztési és emissziós hullámhossztartományokban detektálhatóak: MES-SA (mCherry: Ex.: 587 nm, Em.: 610 nm), B1 (mOrange: Ex.: 548 nm, Em.: 562 nm) és Dx5 (eGFP: Ex.: 488 nm, Em.: 507 nm). A fluoreszcens konstrukciókat lentivirális transzdukcióval juttatták be a sejtekbe, mely stabil fehérjeexpressziót eredményezett. A sejtek ennek megfelelően piros, narancssárga és zöld fluoreszcenciát mutattak (29. ábra). A sejtkultúrákat DMEM tápoldatban tartottuk fenn, $37°C$-on 5% CO_2-t biztosító, párásított inkubátorban. A rutinszerű passzálást 4–5 naponta végeztem. A művelet során a felhasznált tápoldatot eltávolítottam, a sejteket 5 mL steril PBS-sel mostam, majd 1 mL tripszinnel választottam le az adherens sejteket, melyhez 5–7 perces inkubációra volt szükség a teljes leváláshoz. A sejtszuszpenziót ezt követően 4,5 mL DMEM-mel egészítettem ki. A visszaoltáshoz 0,5 mL sejtes oldatot hagytam a flaskában, majd friss DMEM-mel 5 mL-re egészítettem ki, biztosítva a sejtek számára a megfelelő tér- és tápanyagellátást a további proliferációhoz.

A chipfeltöltési kísérletekhez 1 mL sejtszuszpenziót vettem ki, majd 5 percen át centrifugáltam (Eppendorf 5453 MiniSpin). A centrifugálást követően a felülúszót 100 µL-re csökkentettem, és a pelletet vortexeléssel (IKA MS 3 digitális rázókészülék) homogenizáltam, így tömény sejtes oldatot kaptam a további mérésekhez.



29. ábra. A rendelkezésre álló MES-SA sejtek mikroszkópos képei: (A) mCherry (B) mOrange és (C) eGFP fluoreszcens festéssel

8. Eredmények

8.1. Kémiai gradiens kialakításának vizsgálata

A mikrofluidikai chip tervezése Taylor és munkatársai által alkalmazott eszköz architektúráján alapul, melyet a központi idegrendszer neuronjainak, valamint az axonnövekedés vizsgálatára fejlesztettek ki[160]. A struktúra két fő csatornából áll, melyeket kisebb keresztcsatornák kötnek össze, amik négy bemeneten keresztül tölthetőek fel. A struktúra szimmetrikus elrendezése lehetővé teszi a nyomás kiegyenlítését a csatornák megfelelő feltöltése során, ami minimalizálja a nem kívánt folyadékáramlást a fő csatornákban (30. ábra).

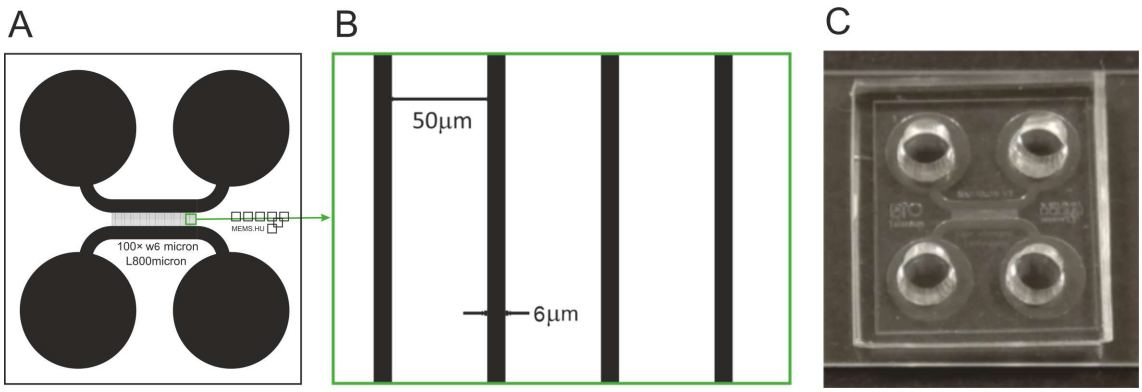
A tisztítás után a csatornák hidrofil tulajdonságának és a mikrofluidikai chipek hermetikus zárásának biztosítása érdekében a felület aktiválásához a chipeket oxigénplazmával kezeltem egy percen keresztül, 51 W teljesítménnyel és 30 sccm O_2 áramlással, egy Diener Electronic Pico alacsony nyomású plazmakezelő rendszerben. Ezt követően a chipeket üveg tárgylemezhez illesztettem, ahol kovalens kötés alakul ki, mely megakadályozza a szivárgást a mérések során. A kémiai gradiens és a diffúzió vizsgálatánál fontos megakadályozni a rendszer szivárgását, hiszen az megváltoztatja a chipen belüli hidrodinamikai viszonyokat.

A kutatás során egy akadályok nélküli, diffúzión alapuló mikrofluidikai eszközt fejlesztettem és vizsgáltam. Az eszköz alkalmas különböző molekulatömegű, fluoreszcensen jelölt fehérjék – például szarvasmarha-szérumalbumin (BSA) és immunglobulin G (IgG) – diffúziós együtthatóinak meghatározására, valamint más fluoreszcens molekulák, például a rodamin B (Rh B) vizsgálatára, mely széles körben használt teszt- és festékmolekula mikrofluidikai alkalmazásokban[47,161,162]. A felhasznált fluoreszcensen jelölt fehérjék a Sigma–Aldrich Kft. által forgalmazott szarvasmarha szérumalbumin – Albumin–fluorescein-izotiocianát konjugátum és humán immunoglobulin-G–FITC voltak, illetve a rodamin B (Rh B) fluoreszcens festékmolekula volt. A mérések során használt fehérjék fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelöltek mely egyedi molekulaként kötődik a fehérjéhez, ezáltal megakadályozza a festékmolekula aggregálódását. Kimutatták, hogy az ilyen típusú festékmolekulák nem változtatják meg számottevően a fehérjék hidrodinamikai sugarát, így a diffúziós együtthatóját sem, ezért alkalmasak diffúziós mérések elvégzésére[163]. Habár a fehérjék tömege megnövekedhet a fluoreszcens jelölés miatt, ez nem olyan mértékű, hogy a diffúziós együttható meghatározását befolyásolja.

A rendszer geometriai elrendezése szimmetriája révén kiegyenlíti és minimalizálja a csatornák közötti hidrosztatikai nyomáskülönbségeket, melyek a kezdeti feltöltés során léphetnek fel. Ezáltal csökkenthető a nyomáskülönbségekből adódó konvektív áramlás hatása a diffúziós együttható meghatározására.

A mikrofluidikai chip feltöltése autonóm áramlással valósítható meg, mely során az áramlási sebességet a csatornák geometriai paraméterei és a csatornafalak felületi tulajdonságai határozzák meg. A hidrofil felületet kontrollált oxigénplazma-kezeléssel alakítottam ki.

Az általam tervezett rendszer előrelépést jelent a korábbi, hasonló munkákhoz képest,[164] mivel kisebb mérete és egyszerű feltöltési protokollja révén gyors méréseket tesz lehetővé, továbbá az automatikus adatfeldolgozó programkód megkönnyíti az adatelemzést és a kiértékelést. A tervezett struktúra a 30.A ábrán, a kész mikrofluidikai chip a 30.C ábrán látható. A struktúra két-két bemenettel, illetve kimenettel rendelkezik – melyeket páronként 800 µm széles és 50 µm magas főcsatornák kötnek össze. Ezek között további vékony 6 µm széles és 10 µm magas keresztcsatornák találhatóak (30.B ábra). A chip mérete 20 × 18 mm^2, a bemenetek átmérője 7000 μm, melyek perforálásához egy 4,63 mm átmérőjű lyukasztót használtam.



30. ábra. (A) A mikrofluidikai struktúra tervezett elrendezése és (C) a kész chip. A középső szekció (B) mutatja a kereszt-csatorna nagyított képét.

8.1.1. Képalkotás

A mérések során az intenzitásprofilok rögzítése egy Zeiss AxioVert A1 inverz fluoreszcens mikroszkóppal végeztem, mely egy Zeiss Axiocam 506 mono kamerával és a Zeiss ZEN 2.6 képfeldolgozó szoftverrel volt felszerelve. A mikroszkóp fluoreszcens LED modul segítségével három hullámhossz-tartományon alkalmas fluoreszcens mérések elvégzésére, melyhez különböző szűrőkészletek állnak rendelkezésre. A hullámhossz-tartományok különböző, jól ismert és széles körben alkalmazott fluorofórokról kapták nevüket: a FITC (fluoreszcein-5-izotiocianát), a Cy3 (cianin-3) és a DAPI (4,6-diamidino-2-fenil-indol). Ezek gerjesztési és emissziós maximumai az 1. táblázatban láthatóak. A kémiai gradiens kialakulásának vizsgálatánál a BSA és az IgG esetében a FITC, a Rh B esetében a Cy3 szűrőkészlet alkalmazásával követtem a fluoreszcens intenzitásprofilok kialakulását és változását. Az expozíciós idő BSA-nál 150 ms, IgG-nél 100 ms, Rh B-nél 10 ms volt.

A főcsatornában felvett intenzitásprofilok kiértékelése az ImageJ 1.52a[4]programmal történt, mely során a megfelelő x-koordinátához tartozó vertikális vonal mentén vettem fel a pixelenkénti intenzitást. A további kiértékelési lépésekhez egy Python programkódot írtam, melynek segítségével történt az adatok normalizálása, illesztése és ábrázolása, a diffúziós állandó meghatározása és az illesztési hibák számolása is. A kiértékelő programkód elérhető a megjelent cikkhez tartozó mellékletben (Függelék 15.2).

Fluorofór	Gerjesztés maximuma [nm]	Emisszió maximuma [nm]
DAPI	359	461
FITC	498	517
Cy3	554	566

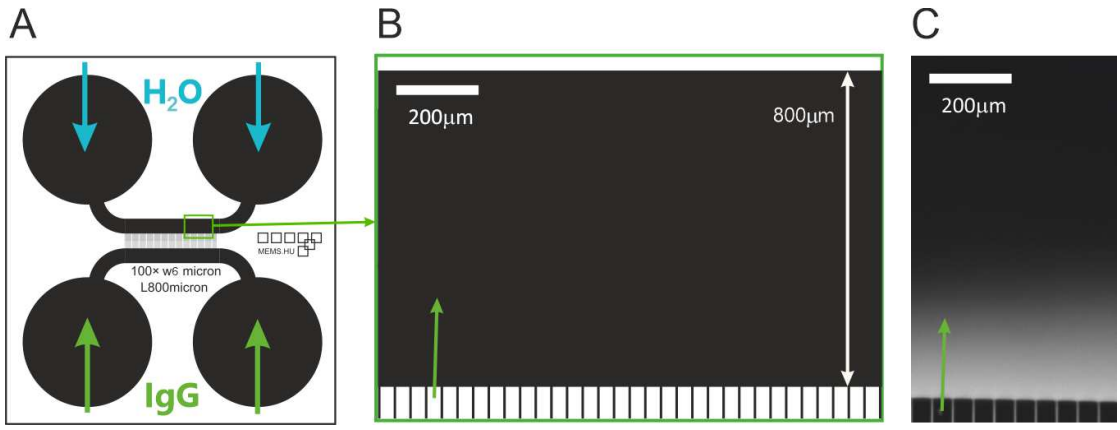
1. táblázat. Flourofórok gerjesztési és emissziós csúcsai

8.1.2. Feltöltési módszer vizsgálata

A struktúra megfelelő feltöltési módszerének kidolgozása kulcsfontosságú volt az egyenletes nyomásviszonyok kialakításához. Ez minimalizálja a folyadékáramlást és lehetővé teszi a stabil diffúzió kialakulását a főcsatornában. A struktúrán belüli buborékképződés elkerülése szintén fontos, mivel az esetleges buborékok befolyásolják a folyadékáramlást és a diffúziót is. A feltöltési kísérleteket, az oldatkészítést és a diffúziós profilok meghatározását 1000-es tisztatérben, stabil, 22 $^{\circ}C$ fokos hőmérsékleten végeztem. A főcsatornák egyik oldalát desztillált vízzel, a másikat fluoreszcens fehérjeoldatokkal töltöttem fel, a megfelelő mennyiségű folyadék bejuttatását a bemeneteken keresztüli pipettázással végeztem (31.A ábra).

A feltöltési kísérletek során két módszer bizonyult hatékonynak: az azonos oldali bemenetek, illetve az átellenes bemenetek egymást követő feltöltése. Mindkét feltöltési protokoll alkalmas stabil diffúziós profil kialakítására, azonban az átellenes oldalak sorrendben történő feltöltése hatékonyabbnak bizonyult, mivel csökkentette a buborékképződés valószínűségét. Ebben az esetben először mindig ioncserélt vízzel töltöttem fel a csatornát, majd ezt követte a fehérjeoldat. A feltöltés módjától függetlenül összesen 40 μl oldat került a főcsatornákba. A feltöltés módja és a kialakuló intenzitásprofil a 31. ábrán látható. A keresztcsatornák elején a koncentráció maximális, míg a főcsatorna állandó koncentrációt biztosít, ezért a diffúzió jellemzésére az állandó felületi koncentrációt leíró komplementer hibafüggvénnyt alkalmaztam.

[4] https://imagej.net/ij/ (Utoljára látogatva: 2026. június 12.)



31. ábra. (A) A mikrofluidikai struktúra elrendezése, nyilakkal jelölve az oldatok feltöltését. (B) A felső csatorna nagyított képe, ahol a diffúziós profil kialakul. (C) A fluoreszcens intenzitás a csatorna hosszában az egyik mérés során.

8.1.3. Fehérjék diffúziós állandóinak meghatározása

Munkám során olyan mikrofluidikai struktúrát hoztam létre, mely lehetővé teszi kontrollált kémiai környezet kialakítását és diffúziós mérések elvégzését. A mikrofluidikai chipek megfelelő tisztítása biztosítja az esetleges szerves szennyeződések, valamint a PDMS vágás során keletkezett törmelékek eltávolítását, melyek jelenléte zavarhatja a fluoreszcens detektálást. A mérések során a chipeket egyszer használtam fel, hogy elkerüljem a nem specifikus felületi fehérjekötődés miatti hatásokat.

A fehérje- és festékoldatok koncentrációját úgy választottam meg, hogy a feltöltés után alkalmasak legyenek fluoreszcens detektálásra és a diffúzió nyomonkövetésére, figyelembe véve a mikroszkóphoz tartozó Zeiss 506 mono kamera érzékenységét, valamint a nagy koncentrációk esetén tapasztalható fluoreszcens kioltást is. Magas koncentrációk esetén jelentkezhet az úgynevezett belső szűrőeffektus (inner-filter effect), mely nemlineáris viselkedést, koncentráció-intenzitás összefüggést eredményez. Kísérletileg meghatároztam tehát azt a tartományt, ahol a fluoreszcens intenzitás lineáris összefüggést mutat a koncentrációval (Függelék F1. ábra, F1. táblázat). A fehérjeoldatok elkészítéséhez ioncserélt vizet használtam oldószerként. A mérésekhez alkalmazott kezdeti koncentrációk BSA esetén 1 mg/ml, IgG esetén 1.3 mg/ml, míg RhB esetén 0.1 mg/ml voltak.

A feltöltés során a hidrodinamikai egyensúly beállta után az anyagok diffúzióját időfelbontásos (time-lapse) fluoreszcens mikroszkópiával követtem nyomon. A mérések a feltöltést követő első 10 percben zajlottak, a bemenetek párolgásának nyomásra gyakorolt hatásának minimalizálása érdekében. Az időfelbontásos képeket 30 másodperces különbséggel készítettem a főcsatornában, ahol a fluoreszcens molekulák diffúziója időben változó koncentrációeloszlást hozott létre. A diffúzió időbeli alakulása a fluoreszcens jel segítségével nyomon követhető, ami példaképp a BSA esetében a 32.A ábrán látható. Az intenzitásprofilokat a felvett képeken az ImageJ 1.52a szoftverrel határoztam meg.

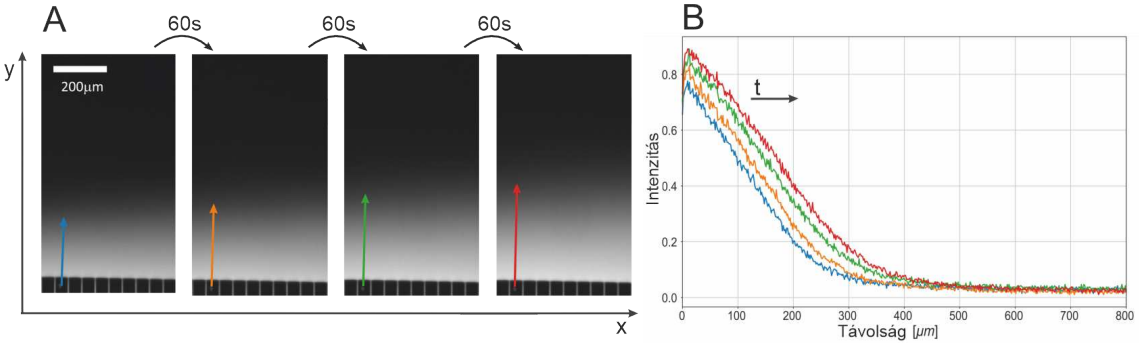
A főcsatorna aljától a tetejéig húzott, pixelméretű függőleges vonalak mentén mért intenzitásokat az összetartozó méréseknél mindig ugyanazon a helyen vettem fel (32.B ábra). A profilvonalat a főcsatorna közepéhez igazítottam a zavaró hatások, például a bemenetek párolgásából származó nyomásváltozások hlminimalizálása érdekében. Az intenzitásprofilokat egymáshoz viszonyítva normáltam. Az intenzitásprofilok felvétele között eltelt idők ismeretében a diffúziós együttható a komplementer hibafüggvény segítségével meghatározható, figyelembe véve a molekulakoncentráció és a fluoreszcens intenzitás közötti lineáris kapcsolatot az alkalmazott koncentrációtartományban. Az illesztett diffúziós együtthatókból a végső értéket két egymás követő profil átlagolásával határoztam meg. A normalizálást, illesztést, ábrázolást és a diffúziós együtthatók kiszámítását saját fejlesztésű Python kóddal végeztem. A kód lehetővé teszi az illesztési hibák becslését, melyek a számított függvények és a mért intenzitásprofilok különbségeiből adódnak. A végső diffúziós együttható hibáját a legnagyobb egyedi illesztés hibájának vettem.

Az illesztési paraméterek (c_0 és D a (8) egyenletben) hatását az eredmények pontosságára a SALib Python modul[5]segítségével végzett érzékenységi analízissel vizsgáltam, mely alapján a kezdeti koncentráció (c_0) csak a forrás közvetlen közelében (< 50 μm) befolyásolja érdemben az illesztés pontosságát, míg a diffúziós együttható (D) a fő tényező a csatorna nagy részében (Függelék F2. ábra). A mért diffúziós együtthatókat az irodalmi értékekkel való összehasonlítás érdekében a hőmérsékletfüggés figyelembevételével korrigáltam.[47] A korrekció elvégzéséhez a Stokes–Einstein-egyenleten szerinti összefüggést alkalmaztam:

$$D_{mc} = D \cdot \frac{T_c \eta}{T \eta_c} \tag{19}$$

ahol T_c a korrigált hőmérséklet, η_c az oldat viszkozitása a korrigált hőmérsékleten.

A mérések során három, különböző molekulatömegű anyag diffúziós együtthatóit határoztam meg: két nagy fehérjéjét – a szarvasmarha szérumalbumint (BSA, 66,5 kDa) és az immunglobulin G-t (IgG, 150 kDa) – valamint egy kis molekulatömegű fluoreszcens festékét, a rodamint B-t (RhB, 479 Da).



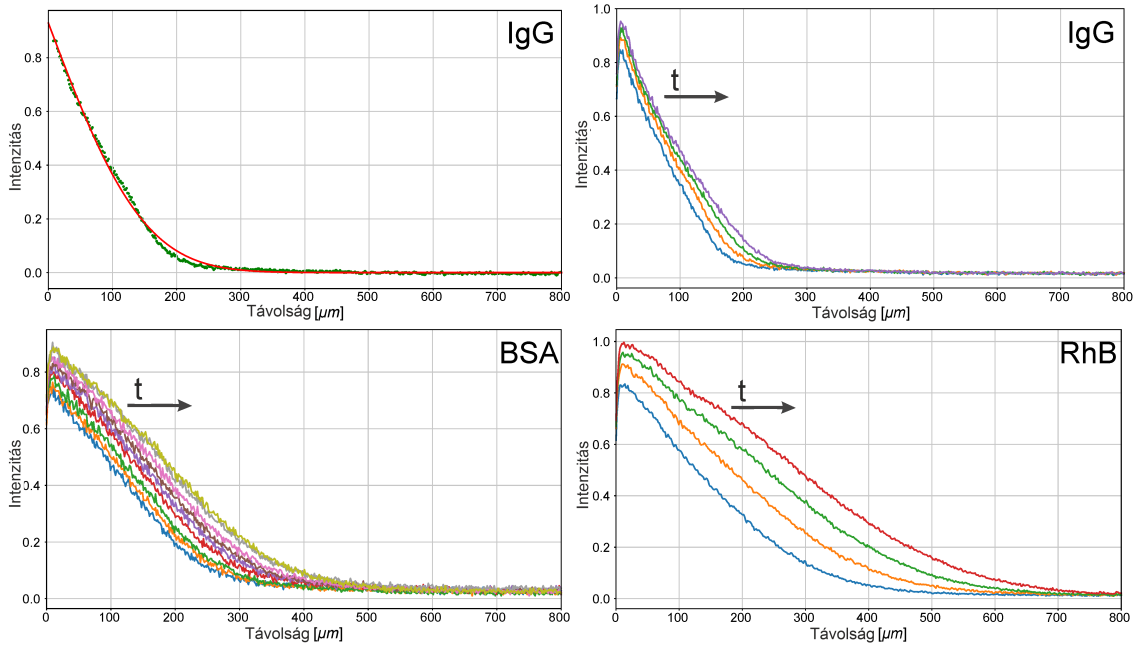
32. ábra. (A) A BSA diffúziójának fluoreszcens képei egy perces időkülönbséggel és (B) a hozzájuk tartozó, ugyanabban az x pozícióban mért intenzitásprofilok ábrázolása

[5] https://salib.readthedocs.io/en/latest/ (Utoljára látogatva: 2026. június 12.)

Különböző nagyságrendbe eső molekulatömegeket választottam, hogy bizonyítsam a mérési módszer alkalmazhatóságát változó méretű molekulák esetén. A mérést akkor fogadtam el további elemzésre alkalmasnak, ha a diffúziós profilra illesztett komplementer hibafüggvény illesztési hibája 1% alatt volt. Ekkor feltételezhető, hogy a főcsatornán belüli diffúzió egyenletes, és a külső körülmények nem befolyásolták, így megfelelő számolt diffúziós együtthatóhoz vezet. A különböző vizsgált anyagok fluoreszcens intenzitásait a főcsatorna mentén a diffúziós forrásként definiált csatornafal távolságának függvényében a 33. ábra mutatja.

Az illesztés pontosnak bizonyult, még akkor is, amikor mérési műtermékek voltak jelen a rendszerben. Például az IgG-oldatban a fehérjék aggregálódtak a csatornában, ami bizonyos profiloknál kiugró intenzitású jeleket eredményezett. Az RhB mérése során a molekula a koncentrációtól függetlenül kikristályosodott az üvegfelületen, illetve a kezdeti áramlás irányában repedésszerű vonalak jelentek meg a felszínen. A kristályosodási jelenség ellenére a mérési módszerrel megfelelő diffúziós együtthatókat kaptam, melyek az anyag látszólagos aggregációja ellenére egyeztek az irodalmi értékekkel, így a számított diffúziós együtthatók pontosságát érdemben nem befolyásolják.

A 33. ábrán látható a komplementer hibafüggvény illesztése a nyers adatokra, illetve a molekuláris diffúzió IgG, BSA és RhB-hoz tartozó profilok időbeli fejlődése a csatorna mentén. A mérések időtartama a különböző molekulák esetén néhány perctől akár több tíz percig is tarthatott a diffúzió sebességétől és kiterjedésétől függően. A nagyobb fehérjék esetében a mérés hosszabb időt vett igénybe a kisebb diffúziós együttható miatt.



33. ábra. Az első ábra az IgG diffúziója esetén felvett adatpontokat (zöld) és az illesztett komplementer hibafüggvényt (piros) mutatja, példaként szolgálva az 1% alatti illesztési hibára. Az IgG, BSA és RhB diffúziós profiljának időbeli fejlődése a főcsatornában a többi ábrán látható.

Ezzel szemben a kisebb RhB molekula gyorsan szétváló fluoreszcens profilokat eredményezett, ami nagyobb diffúziós együtthatóra utal, összhangban a molekulatömeggel és a méretbeli különbségekkel. Megfigyelhető, hogy minél kisebb a diffúziós együttható, annál meredekebbek a profilok, azaz annál élesebb a koncentrációeloszlás. A mikrofluidikai rendszer a mérések kezdeti szakaszában bizonyult a legstabilabbnak, amikor a bemenetekből származó párolgás mértéke elhanyagolható volt.

A 2. táblázat tartalmazza a mérésekből származtatott diffúziós együtthatókat (D_m), azok hőmérséklet-korrigált értékeit (D_{mc}), valamint az irodalomból származó, elvben hasonló fluoreszcens mérésekkel kapott értékeket (D_l), míg a 3. táblázatban pedig a más, elterjedt diffúziós mérési módszerek eredményeivel – például dinamikus fényszórással (DLS) és magmágneses rezonanciával (NMR) – hasonlítja össze az általam kapott eredményeket. Az általam mért diffúziós együtthatók a BSA esetében 64,24 $\mu m^2\ s^{-1}$, az IgG esetében 39,3 $\mu m^2\ s^{-1}$ és az RhB esetében 372,74 $\mu m^2\ s^{-1}$ voltak. Ezek az értékek jól közelítik az irodalmi adatokat, azonban jellemzően az ott megadott tartományok alsó határához állnak közelebb, ami valószínűleg a fluoreszcens festésből származó többletsúlynak köszönhető.[165] A keresztcsatornák végén lévő magasabb koncentráció nemlinearitást okozhat a csatornák elején, ami magasabb intenzitást eredményez a profilok kezdeti szakaszán (33. ábra). Ennek ellenére ez a diffúziós állandó meghatározását nem befolyásolja, mivel az illesztés az egész profilra vetítve korrigálja az esetleges nemlineáris viselkedést.

2. táblázat. A mért diffúziós együtthatók összehasonlítása a szakirodalomban található, fluoreszcens módszerekkel kapott értékekkel[47,166,167]

T [°C]	D [$\frac{\mu m^2}{s}$]	BSA	IgG	Rh B
22	D_m	64.24 ± 0.63	39.3 ± 0.38	372.74 ± 3.32
20	D_{mc}	60.8 ± 0.59	37.19 ± 0.36	N/A
	D_l	60.7 ± 5.46	38 ± 1.29	
21.5	D_{mc}	N/A	N/A	367.68 ± 3.27
	D_l			360 ± 0.00
25	D_{mc}	69.59 ± 0.68	N/A	403.78 ± 3.59
	D_l	63.8 ± 0.015		427 ± 0.04

3. táblázat. A mért diffúziós együtthatók összehasonlítása a szakirodalomban található, nem fluoreszcens módszerekkel kapott értékekkel[168–170]

T [°C]	D [$\frac{\mu m^2}{s}$]	BSA	IgG	Rh B
22	D_m	64.24 ± 0.63	39.3 ± 0.38	372.74 ± 3.32
20	D_{mc}	60.8 ± 0.59	37.19 ± 0.36	N/A
	D_l	60.6 ± 0.7	38.9 ± 0.2	
22.5	D_{mc}	N/A	N/A	377.77 ± 3.36
	D_l			420 ± 30

[T1] Szabad molekuladiffúzió vizsgálatára alkalmas mikrofluidikai rendszert terveztem és alakítottam ki, mely lehetővé teszi fluoreszcens molekulák diffúziós állandóinak optikai detektáláson alapuló meghatározását, az időben változó koncentráció gradiens profil követésével és elemzésével.
[P1] [C2] [C3]

(i) A mikrofluidikai rendszer szerkezete egyedülálló módon, akadályok és membránok nélkül teszi lehetővé szabad molekuladiffúzió vizsgálatát. Megmutattam, hogy az általam tervezett architektúra – megfelelő mérési protokoll mellett – biztosítja az állandó felületi koncentráció kialakulását a főcsatornában, lehetővé téve a komplementer hibafüggvény alkalmazását a diffúziós folyamat matematikai leírására. A szimmetrikus csatornarendszer, a nagy (7mm) átmérőjű bemeneti nyílások és a jelentős hidrodinamikai ellenállással rendelkező – 10µm (m) x 6µm (sz) x 800µm (h) – mintainjektáló kapillárisok csökkentik a hidrosztatikai nyomáskülönbségekből adódó konvektív hatásokat.

(ii) Megmutattam, hogy a fejlesztett eszköz és módszer megbízhatóan alkalmas lokális optikai zajt létrehozó folyamatok (pl. fehérje aggregáció) hatásainak kiküszöbölésére és lehetővé teszi fehérjék diffúziós állandóinak gyors, 10 percen belüli mérését.

(iii) Az optikai mérés kiértékeléséhez fejlesztett Python programkód alkalmazásával meghatároztam három, különböző nagyságrendbe eső tesztmolekula – BSA, IgG és RhB – diffúziós állandóit, melyek a definiált 1%-os függvényillesztési hiba kritérium esetén, molekulák méretétől és a referencia mérési módszertől függően 1-10%-os eltéréssel megegyeztek az irodalmi értékekkel.

8.2. Elektródák integrálása mikrofluidikai rendszerekbe

Az optikai és elektromos módszerekkel végzett sejtszintű vizsgálatok együttes alkalmazása hatékony módszer lehet a sejtek tulajdonságainak és élettani változásainak megfigyelésére. A vizsgálati módszer és az eszközök fejlesztésének távlati célja az optikai vizsgálatok kiváltása, mivel ez a módszer általában fluoreszcens jelölést igényel, ami az általánosan használt fluoreszcens festékek esetén befolyásolhatja a sejtek viselkedését[171–173]. Célom olyan teljesen elektromos, nem invazív mérési módszert megvalósító mikrofluidikai megoldás fejlesztése volt, mely számos biológiai kutatás vonatkozásában hasznos lehet. Ehhez olyan mikrofluidikai eszközöket terveztem és valósítottam meg, mely integrált hidrodinamikai csapdákkal képes sejtcsoportok, illetve egyedi sejtek lokalizálására az integrált mérőelektródák között. A rendszer lehetővé teszi az impedancia spektroszkópiai és az optikai mérések párhuzamos kivitelezését, mely az elektromos mérések kezdeti optikai validálására szolgál. Ezáltal valós idejű, részletes mérésekkel jellemezhető a lokalizált sejtek mikrokörnyezetükre gyakorolt hatása. A rendszer fantázianeve CELLAN, mely az angol Cell Analytical Device kifejezés rövidítése.

A rendszer működőképességének (proof-of-concept) igazolására élesztőgombákat használtam (*S. cerevisiae*), mivel ezek a sejtek gyors osztódásuk és egyszerű tenyésztési lehetőségeik révén ideális modellt jelentenek[100]. A kutatás végső fázisában humán rákos sejtekkel is végeztem méréseket, ahol többféle festett méhnyakrákos sejtvonal állt rendelkezésre a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoportjának jóvoltából: MES-SA mCherry, Dx5 (doxorubicin rezisztens) eGFP és B1 mOrange sejtek. Ezeknél a sejteknél a fluoreszcencia jelzi, hogy életben vannak-e, így alkalmasak voltak a viabilitás változásának elektromos és optikai követésére is.

8.2.1. Képalkotás

A mikrofluidikai chipek megfelelő töltődését és a sejtcsapdázás hatékonyságát egy Zeiss AxioVert A1 inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam. Az élesztősejtek életképességét propidium-jodid festéssel követtem nyomon a Cy3 szűrőkészlet alkalmazásával. A képek készítéséhez, illetve feldolgozásához szintén a Zeiss Axiocam 506 mono kamerát és a Zeiss ZEN 2.6 képfeldolgozó szoftvert használtam. A zölden világító MES-SA Dx5 sejtek esetén a FITC, a narancssárgán világító B1 sejtvonal és a pirosan világító MES-SA sejtek esetén a Cy3 szűrőkészletet használtam.

Az integrált elektródák beható vizsgálatát egy Zeiss LEO 1540 XB kettős nyalábú pásztázó elektronmikroszkóppal végeztem, mely egy Oxford Ultimax 40 EDX detektorral van felszerelve. Ennek segítségével nanométeres felbontású képek, valamint mikrométeres felbontású elemtérképek készíthetőek.

8.2.2. Anyagvizsgálati és megmunkálási módszerek

A mikrofluidikai rendszer vizsgálata során a képalkotó módszerek mellett különböző anyagvizsgálati és megmunkálási módszereket is alkalmaztam. Az elektródák távolságának pontos beállítása érdekében az optikai litográfia felbontáskorlátait fókuszált ionsugaras marás alkalmazásával hidaltam át. A kezdetben összekötött elektródák szétválasztása egy ThermoScientific Scios 2 kettős nyalábú SEM / nanoprocesszáló rendszerrel történt, mely Oxford Xmax 20 EDX detektorral van felszerelve. A berendezés fókuszált Ga^+ ionforrással rendelkezik, melynek segítségével fókuszált ionsugaras marással mikro- és nanoméretű réseket hoztam létre az elektródák között. A chipek kialakítása, feltöltése és mérése után visszamaradt vagy lerakódott anyagok pontos összetételét energiadiszperzív röntgenspektroszkópiával vizsgáltam, így ellenőriztem az elektródák közötti esetleges rövidzárak okait.

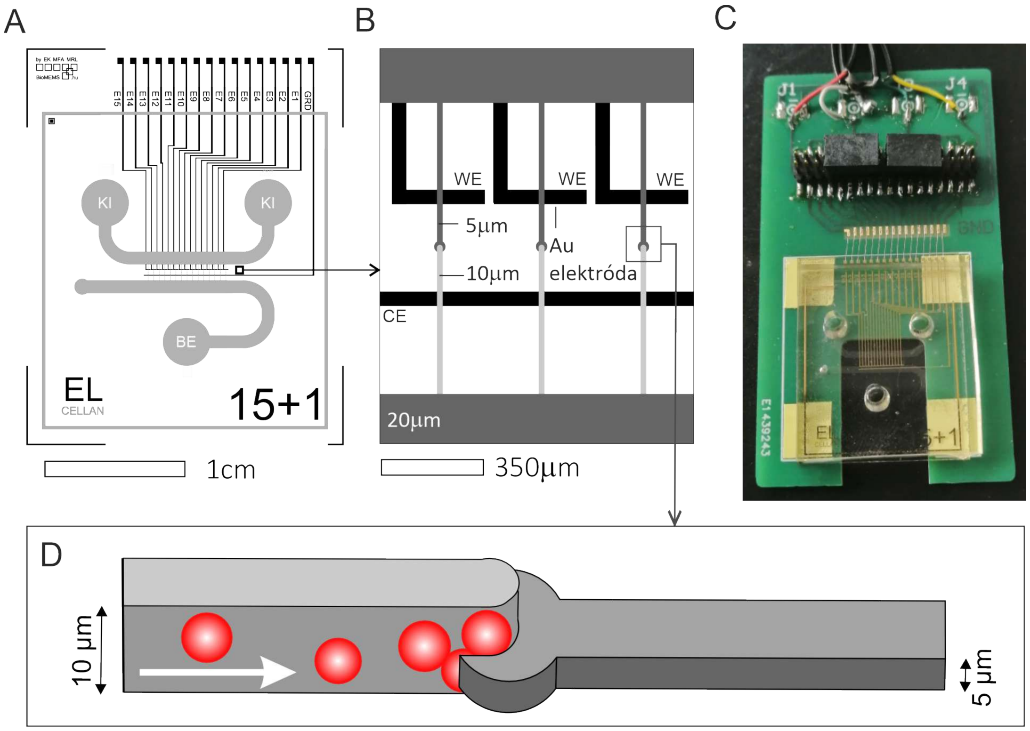
8.2.3. CELLAN - PDMS mikrofluidikai rendszer integrált elektródákkal

A kezdeti vizsgálatok során az elektródák környezetében elhelyezkedő sejtek számának EIS spektrumra gyakorolt hatásait vizsgáltam, mivel a fejlesztett rendszer potenciálisan alkalmas lehet a sejtek mikrokörnyezetben történő proliferációjának nyomon követésére. A kialakított struktúra a diffúziós mérésekre alkalmazott mikrofluidikai chip továbbfejlesztett változata. A ki- és bemenetek átmérőit lecsökkentettem, így csökkentve a párolgási felületet, illetve a feltöltési protokoll egyszerűsítése érdekében az egyik bemenetet elhagytam, így csak egy szellőzőnyílás biztosítja a megfelelő feltöltést és a folyadékáramlást a két kimenet felé (34.A ábra). A keresztcsatornák vertikális szűkítésével a struktúra alkalmas sejtcsapdázásra, illetve a hozzá illesztett elektródaelrendezés lehetővé teszi az egyes csatornák impedancia spektrumának rögzítését. A két elektróda között csapdázott sejtek megváltoztatják a rendszer jellemző impedanciáját, ezáltal lehetővé téve a sejtszám, valamint biofizikai tulajdonságaik – például a méret és az életképesség – vizsgálatát.

A mikrofluidikai csatornák kialakítása PDMS-ben történt a 6.1.2. fejezetben leírtak szerint. A különböző magasságú csatornaszakaszok létrehozásához az öntőforma megfelelő rétegeinek kialakítása három lépésben történt, SU-8 2005, 2010 és 2025, eltérő viszkozitású fotoreziszt lakkok használatával. A PDMS-t 1:200 arányban polietilén-oxiddal (PEO) módosítottam, mely hidrofillá teszi az elasztomert. Ez biztosítja a csatornák megfelelő feltöltődését, viszont az oxigénplazmás bondolás így már nem kivitelezhető. A PDMS chipek üveg hordozóra való illesztését mikroszkóp alatt végeztem, manuálisan. A PDMS hidrofilizálásához használt PEO-t a Polysciences Europe GmbH gyártotta.

A módosított mikrofluidikai struktúra két fő csatornáját 15, függőlegesen szűkülő keresztcsatorna köti össze, ezáltal lehetővé teszik a sejtcsapdázást. Az EIS mérésekhez az integrált elektródákat úgy terveztem, hogy lehetővé tegyék az egyes csatornák egyedi monitorozását.

Az elektromos mérésekhez egy, a csatornák alatt futó közös referenciaelektródát (CE) terveztem, valamint egyedi munkatelektródákat (WE), melyek lehetővé teszik az egyes csatornák egyedi mérését. Az elektródák elrendezését a 34.B ábra mutatja. Az elektromos mérések kivitelezéséhez a struktúrához készült egy egyedileg tervezett nyomtatott huzalozású lemez (NYÁK), mely segítségével akár több csatorna párhuzamos mérése is elvégezhető (34.C ábra). A mikroelektródák huzalkötéssel csatlakoznak a NYÁK-hoz, mely áthidalja a mikro- és a makrofelületek közötti méretkülönbséget. A NYÁK segítségével a struktúra könnyen csatlakoztatható a mérőeszközhöz, mely esetemben egy PalmSens4 potenciosztát volt. Ez az eszköz 10 µHz–1 MHz frekvenciatartományon képes EIS mérések elvégzésére. A mért adatok kiértékelését és a különböző paraméterek meghatározását az ekvivalens áramkör illesztés segítségével, a potenciosztáthoz tartozó vezérlő- és elemző szoftverrel (PS Trace 5.8) végeztem. A NYÁK alsó részén található optikai ablak betekintést biztosít a csatornákba, lehetővé téve az elektromos mérések mellett a csatornák töltődésének, a sejtcsapdázásnak és a sejtek fluoreszcens jelénel optikai nyomon követését.



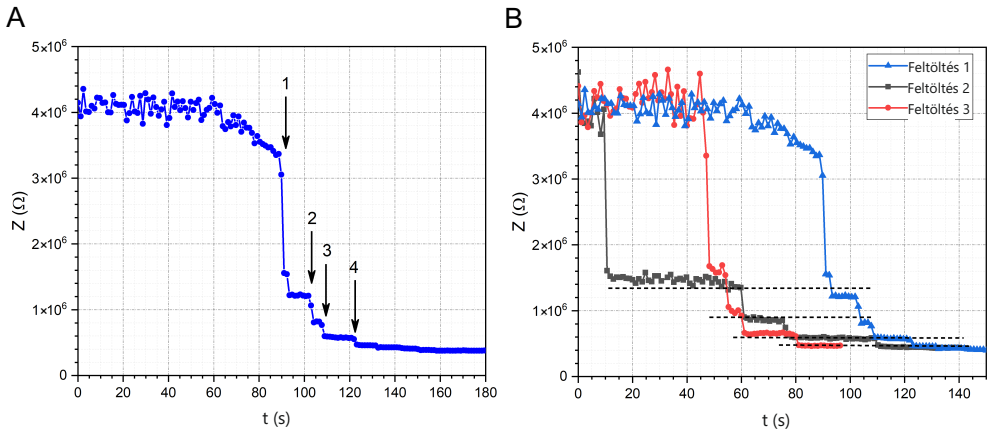
34. ábra. (A) A mikrofluidikai chip tervezett elrendezése (szürke) és az integrált elektródarendszer (fekete). (B) A csapdázási régió nagyított képe, melyen jól látszik a keresztcsatornák (szürke) és az elektródák elrendezése. (C) A kész eszköz: a legyártott mikrofluidikai chip és a speciálisan tervezett nyáklap, az alsó optikai betekintő ablakkal. (D) A csapdázás sematikus ábrája szemlélteti, hogy a csatornán belüli magasságkülönbség miként vezet a sejtek csapdázásához.

Az elektródák szélessége 50 µm, elrendezésüket pedig úgy terveztem, hogy a mikrofluidikai csatornákat tartalmazó PDMS kézi illesztése a lehető legkönnyebb legyen. A referenciaelektróda és a munkatelektróda közötti távolság 300 µm, ami lehetővé teszi az elektródák mikroszkóppal történő pontos igazítását, így a csapdák megfelelő helyre kerülnek a csatornákban, az elektródák közé.

Az elkészült chip mérete 20 × 18 mm^2, a főcsatornák magassága 20 µm és szélessége 800 µm. A vertikálisan szűkülő keresztcsatornák magassága 10 µm-ről 5 µm-re csökken, szélességük 20 µm. A ki- és bementek átmérője 3000 µm, melyek a lyukasztás után alkalmassá válnak a csatornák feltöltésére.

8.2.3.1. A mikrofluidikai rendszer feltöltése

Az eszköz töltődésének vizsgálatához a csatornákat 20 µl 0,01 M PBS oldattal töltöttem fel. A csatornák feltöltésének elektromos vizsgálatához négy párhuzamos arany elektróda időfüggő impedanciáját követtem nyomon. Alacsony frekvenciákon az impedanciaspektrumot főként az elektródák saját jellemzői határozzák meg, ezért az impedanciát fix 1 kHz-es frekvencián mértem[67]. Ahogy a pufferoldat eléri az elektródákat a spektrumban lépcsőszerű impedanciacsökkenés figyelhető meg, mely a közeg fajlagos vezetőképességéből adódik (35. ábra). A megjelenő lépcsők a mikrofluidikai rendszer feltöltődését és az elektródák megfelelő válaszát mutatják, mely így alkalmas az elektródák és a használt oldat előzetes jellemzésére. A lépcsők nagysága $1/Z$ arányban csökken, ahogy a párhuzamos elektródák elektromosan záródnak és összekapcsolódnak. A 35.B ábra három megismételt feltöltés esetén mutatja a mérések reprodukálhatóságát, a szaggatott vonalak jelzik a csatorna feltölődése után stabilizálódott impedancia átlagértékeit.



35. ábra. (A) A csatornák feltöltődése a spektrumon megjelenő lépcsők alapján követhető. A lépcsőket nyilak jelzik, ezáltal követhető, hogy a folyadék mikor éri el az elektródákat. (B) A mérés reprodukálhatósága többszöri feltöltés esetén.

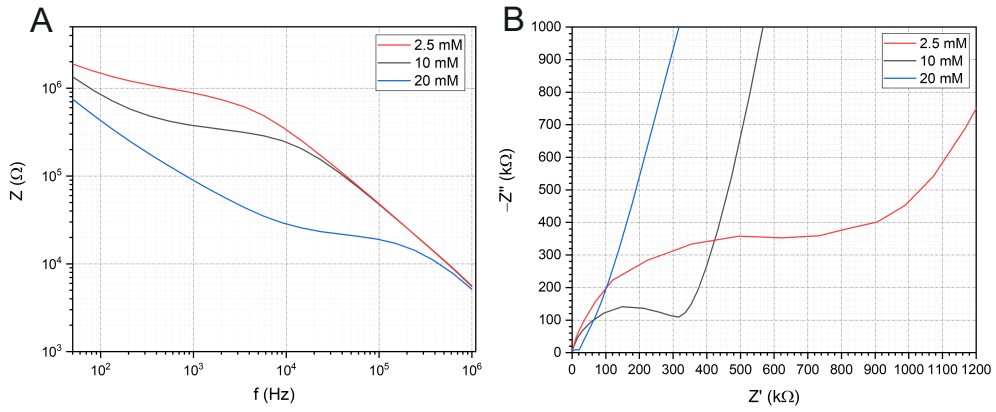
A 4. táblázatban láthatóak a különböző feltöltésekhez tartozó átlagos impedanciaértékek és azok szórásai. A mérés kezdetén az áramkör nyitva van, ami a Z nagyon magas értékéből is látszik. Amikor a folyadék eléri az elektródafelületet és elkezdi feltölteni azt, egy kisebb meredek csökkenés következik, majd megjelenik az első lépcső. Ezt követően, ahogy az oldat a további elektródákhoz ér, újabb lépcsők jelennek meg a spektrumban.

4. táblázat. Az mért impedanciaértékek átlagai és szórása a feltöltési lépcsőknél

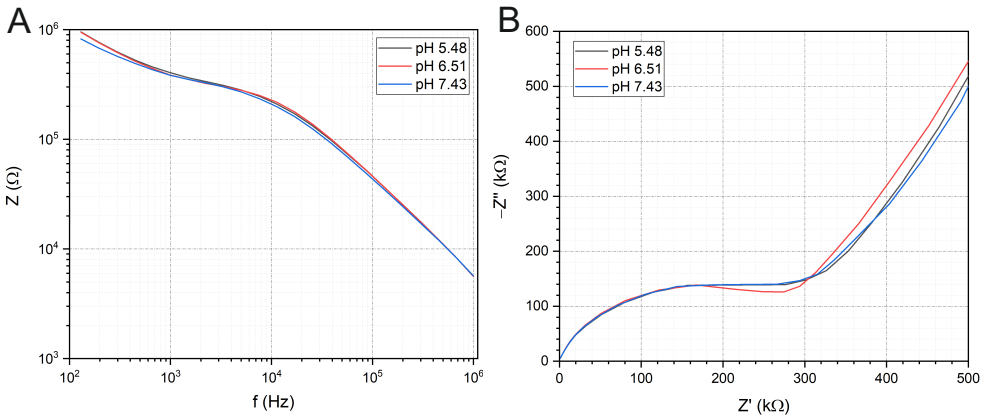
Lépcső	**Feltöltés 1 (Ω)**	**Feltöltés 2 (Ω)**	**Feltöltés 3 (Ω)**	**Átlag (Ω)**
1	$1.46 \times 10^6 \pm 6.21 \times 10^4$	$1.26 \times 10^6 \pm 1.48 \times 10^5$	$1.37 \times 10^6 \pm 3.19 \times 10^5$	$1.37 \times 10^6 \pm 1.00 \times 10^5$
2	$8.66 \times 10^5 \pm 2.25 \times 10^4$	$8.04 \times 10^5 \pm 2.54 \times 10^4$	$9.89 \times 10^5 \pm 4.93 \times 10^4$	$8.86 \times 10^5 \pm 9.44 \times 10^4$
3	$5.91 \times 10^5 \pm 3.23 \times 10^4$	$5.77 \times 10^5 \pm 1.12 \times 10^4$	$6.53 \times 10^5 \pm 8.74 \times 10^3$	$6.07 \times 10^5 \pm 4.09 \times 10^4$
4	$4.44 \times 10^5 \pm 9.77 \times 10^3$	$3.98 \times 10^5 \pm 2.61 \times 10^4$	$4.68 \times 10^5 \pm 3.35 \times 10^3$	$4.37 \times 10^5 \pm 3.56 \times 10^4$

8.2.3.2. Funkcionális validáció

A mikrofluidikai rendszer funkcionális validációjához különböző koncentrációjú és pH-jú PBS-oldatokat állítottam elő és ezekkel vizsgáltam az impedancia spektrumok alakulását. Az oldatokat 100 mL, 200 mL és 800 mL ioncserélt vízben feloldott PBS tablettákkal készítettem, melyek rendre 20 mM, 10 mM és 2,5 mM koncentrációjú oldatot eredményeztek. Az oldatok EIS spektrumát 1 Hz és 1 MHz között vizsgáltam, melyek Bode- és Nyquist-diagramja a 36. ábrán látható. Az oldatok koncentrációjának növelésével a mért impedancia csökken, ami a rendszer vezetőképességének növekedésére vezethető vissza. Ez a Bode-diagramon (36.A ábra) az impedancia abszolút értékének csökkenésében, a Nyquist-diagramon (36.B ábra) pedig a különböző koncentrációkhoz tartozó körív sugarának csökkenésében figyelhető meg. A pH-függést 10 mM PBS-oldatban vizsgáltam: pH 5,48; pH 6,51 és pH 7,43 értékek esetén. Az arany elektródák impedanciája nem mutatott számottevő pH-érzékenységet az EIS mérések során (37. ábra).



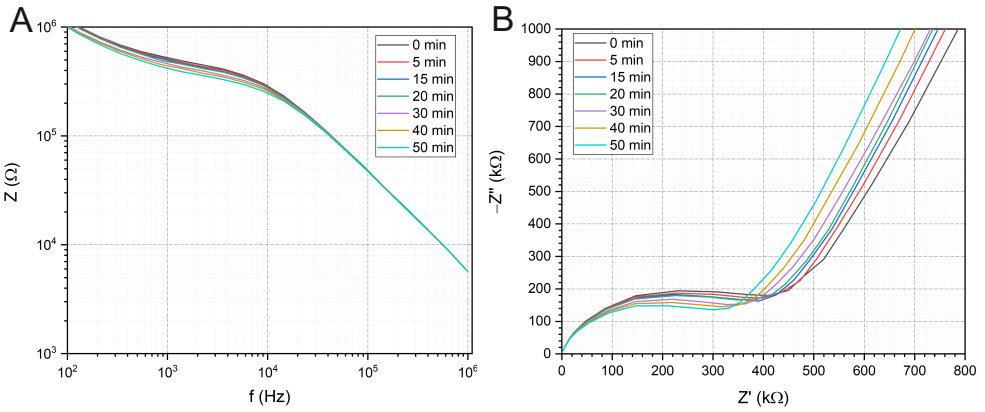
36. ábra. Az impedanciaspektrum koncentrációfüggése különböző higítású PBS oldatok esetén: (A) az impedancia nagysága Bode-diagramon és (B) a Nyquist-diagram.



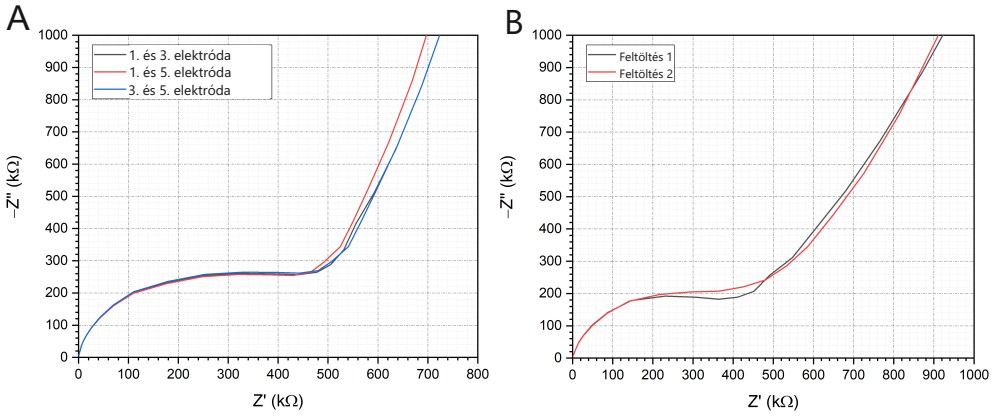
37. ábra. Az arany elektródák pH függésének vizsgálata különböző pH-jú PBS oldatok esetén: (A) az impedancia nagysága Bode-diagramon és (B) Nyquist-diagram.

8.2.3.3. Reprodukálhatósági vizsgálatok

A mérések reprodukálhatóságának és stabilitásának vizsgálatához PBS oldattal ismételt feltöltéseket végeztem, miközben hosszabb időn keresztül (50 min) követtem az EIS spektrumot. A spektrumokat 5–10 percenként rögzítettem (38. ábra). Az impedancia a mérés első 10–15 percében csupán kis mértékben változik az alacsony frekvenciatartományban (10^4 Hz alatt), ami a rendszer elektromos tulajdonságainak stabilizálódása miatt van. Idővel az impedancia lassan csökken a nyitott bemeneti nyílásokon keresztüli párolgás miatt, mely a koncentráció növekedéséhez vezet. Ettől eltekintve a rendszer stabil, a mérési tartományon belül legfeljebb 20%-os, 30 percen belül pedig 10%-nál kisebb eltérést tapasztaltam. Három különböző elektróda EIS spektrumának összehasonlítása szintén stabil eredményeket adott: az első, harmadik és ötödik elektródát páronként vizsgálva kaptam a spektrumokat. Az ismételt felhasználhatóságot ugyanazon chip közvetlen újratöltésével ellenőriztem (39. ábra). Mindkét esetben az EIS spektrumok magas reprodukálhatóságot mutattak.



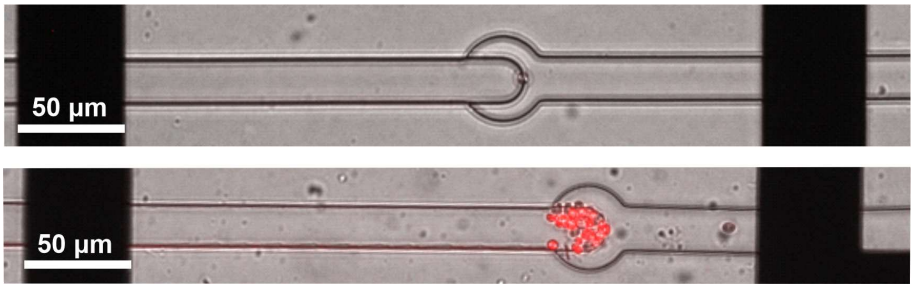
38. ábra. A rendszer 50 percen keresztüli stabilitásának vizsgálata: (A) az impedancia nagysága Bode-diagramon és (B) Nyquist diagram.



39. ábra. (A) Különböző elektróda párokon mért impedancia spektrumok Nyquist diagramja, illetve a (B) másodszori feltöltés hatása a spektrumra

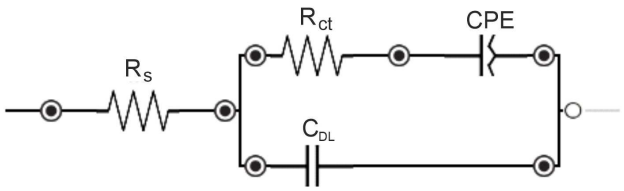
8.2.3.4. Sejtcsapdázási vizsgálatok

A tervezett rendszer lokalizált sejtek vizsgálatára való alkalmasságát *S. cerevisiae* élesztősejtekkel vizsgáltam, a szűkülő csatornákban való csapdázással és az EIS spektrumra gyakorolt hatásuk jellemzésével. Az élesztőoldat PBS-ben készült, 0.05 mg/mL koncentrációban, mely körülbelül 10^6 élesztősejtet jelent milliliterenként. Ez a koncentráció optimális az egyedi sejtek csapdázására a szűkülő mikrofluidikai csatornákban, illetve a propidium-jodidos életképességi vizsgálatokhoz is. A sikeresen csapdázott sejtek számát fluoreszcens mikroszkóppal követtem. A sejtek életképességének változása propidium-jodid festéssel vizualizálható, melynek megvilágításához és detektálásához a mikroszkóp Cy3 fluoreszcens szűrőkészletét használtam. A rendszer biokompatibilitását egy másik kialakítású chip esetén a 9.1.1. fejezetben tárgyalom. A 40. ábrán piros festéssel látható, hogy a csapdázott sejtek közül melyik él és melyik pusztult el. A halott sejtek sejtmagja permeábilissá válik, ezáltal a nukleinsavfesték behatol oda, és megfesti azt. EIS mérésekkel követtem a sejtek impedancia spektrumra gyakorolt hatását, illetve a spektrum alapján a sikeresen csapdázott sejtek számának megkülönböztetése volt a célom.



40. ábra. Egy darab élesztősejt a mérőelektródák között csapdázva (fent) és a propidium-jodid festés, ami a sejtek életképességét mutatja (lent)

Az ekvivalens áramköri modellezést a PalmSense4 potenciosztáthoz tartozó PSTrace 5.8 szoftverrel végeztem. A szoftver az impedanciaspektrumok rögzítése mellett képes a paraméterek illesztésére is. Az illesztés során a Randles modellt úgy módosítottam, hogy illeszkedjen a mért görbékhez és jelenségekhez. Ehhez a Warburg-elemet – mely normál esetben az alacsony frekvenciákon jelentkező diffúziós viselkedést írja le, és a Nyquist-diagramon 45°-os egyenes formájában jelenik meg – egy konstans fázisú elemmel helyettesítettem. Ez figyelembe veszi a rendszerben található további kapacitív viselkedést, mely ~70°-os egyenest eredményezett az alacsony frekvenciatartományban (41. ábra).

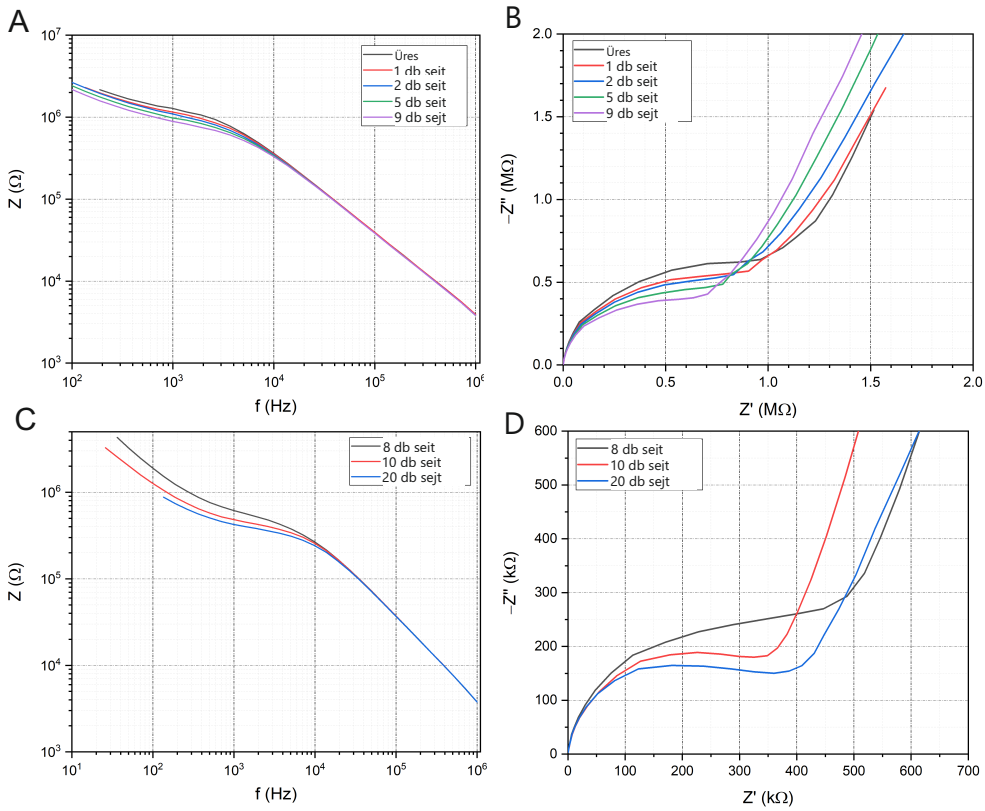


41. ábra. A Randles-cella ekvivalens áramköri modellje, a Warburg elem CPE-re való módosításával

A sejtcsapdázási méréseket egyedi, illetve három párhuzamosan kapcsolt elektródával végeztem. A sejtek csapdázása a feltöltés során sztochasztikusan zajlik, így az egyes elektródák között eltérő sejtszám alakulhat ki. A csapdázás folyamatát optikai mikroszkóppal követtem, a rendszer stabilizálódása és a sejtek csapdázódása után rögzítettem az EIS spektrumokat a kiválasztott elektródákon. A spektrumok közötti különbségeket 0 (üres csapda), 1, 2, 5 és 9 csapdázott élesztősejt esetén vizsgáltam az egyedi elektródák segítségével. Három elektróda együttes használatával 8, 10 és 20 sejt impedanciáját mértem, mely a három elektródán összesen csapdázott sejtek összegét jellemzi. A mért spektrumok a 42. ábrán láthatóak.

A felvett EIS spektrumot a fentebb definiált Randles-cellával illesztettem, és meghatároztam a megfelelő paramétereket: az (extracelluláris) oldat ellenállását (R_s), a töltésátadási ellenállást (R_{ct}), az elektromos kettősréteg kapacitását (C_{DL}), illetve a konstans fáziselemet (CPE). A csapdázott élesztősejtek impedancia spektrumra gyakorolt hatása összhangban van az irodalomban közölt eredményekkel[71]. Az említett paramétereken kívül a sejtmembrán kapacitása (C_m) is jellemezheti a sejtek állapotát magas frekvenciákon[96,174,175], azonban a mérési elrendezésünkben nem állt rendelkezésre a megfelelő frekvenciatartomány (> 1 MHz) a C_m hatásának vizsgálatához.

A különböző sejtszámok csapdázása során szignifikánsan változó paraméter az R_{ct} volt (Függelék F2. táblázat). Ez a töltésátadási ellenállás az oldat és a citoplazma közötti transzmembrán ioncserét jellemzi, mely az elektródafelületen kialakuló elektromos kettősréteg vezetőképességét növeli ionadszorpció révén[71,176]. Az R_{ct} illesztett értékei és az illesztés hibái mindkét esetben az 5. táblázatban láthatóak.



42. ábra. Bode és Nyquist diagramok különböző számú csapdázott sejtek esetén (A, B) egyedi elektródák és három párhuzamos elektróda esetén (C, D)

Az egyedi elektródákkal végzett mérések korrelációt mutattak az R_{ct} értékeiben, egyedi elektródák esetén a Spearman korreláció $r_s = -0.99$ (p-érték: $p = 1.40 \cdot 10^{-24}$) , a Pearson korreláció pedig $r = -0.92$ ($p = 0.029$) volt. Három párhuzamos elektróda esetén $r_s = -1$ ($p = 0.0$), $r = -0.92$ ($p = 0.25$) volt. A korrelációs értékekből jól látszik, hogy alacsony sejtszám esetén az összefüggés közel lineáris, viszont párhuzamos elektródák esetén, több sejtet vizsgálva, ez már nem igaz.

A vizsgálatot megnehezítette, hogy a feltöltési protokoll kivitelezése során nem volt pontosan szabályozható, hány sejt csapdázódik az egyes csatornákban. Az összekapcsolt elektródák esetében az R_{ct} alapértéke csökkent a párhuzamos mikrofluidikai csatornák együttes vizsgálata során, míg a CPE az egyedi elektródás mérésekhez képest megnövekedett a nagyobb elektródafelület következtében. A módosított oldatösszetétel (kiegészítő glükóz és propidium-jodid festés nyolc sejt vizsgálatakor) esetén enyhe változást tapasztaltam az oldat ellenállásában.

5. táblázat. A csapdázott sejtek száma és a töltésátadási ellenállás (R_{ct}) illesztett értékei az egyedi (felső rész) és a három párhuzamos (alsó rész) elektróda esetén

Sejtszám [db]	$\boldsymbol{R_{ct}}$ [kΩ]
0	1106 ± 6.91%
1	1009 ± 7.70%
2	898.8 ± 4.44%
5	814.8 ± 4.34%
9	758.4 ± 2.72%
8	466.1 ± 3.99%
10	405.4 ± 2.72%
20	349.5 ± 3.44%

TÉZIS

[T2] Integrált elektródákat és vertikális csapdaszerkezetet tartalmazó PDMS alapú mikrofluidikai rendszert hoztam létre, mely képes sejtcsoportok, vagy egyedi sejtek csapdázására, illetve a sejtek számának párhuzamos optikai és elektromos nyomon követésére.
[P2] [P3] [C4]

(i) Megmutattam, hogy a mikrofluidika rendszer egyedi csatornáinak médiummal való feltöltése 1 kHz-es frekvencián végzett folytonos impedancia méréssel követhető.

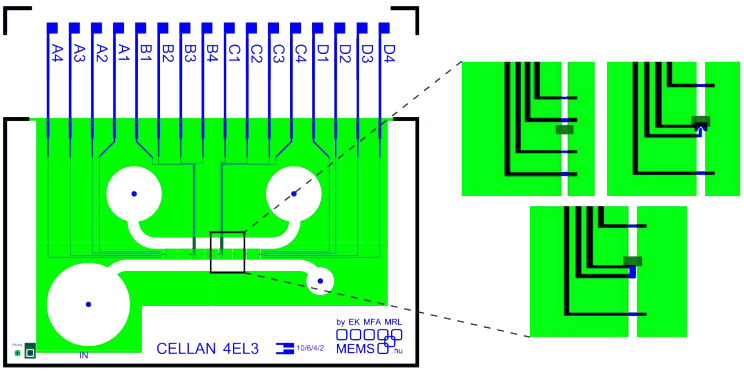
(ii) A megvalósított mikrofluidikai rendszerben elektrokémiai impedancia spektroszkópiával vizsgáltam a sejtszám spektrumra gyakorolt hatását S.cerevisiae élesztő sejtek esetén. Megállapítottam,hogy a javasolt módosított Randles ekvivalens áramköri modell illesztése során a töltésátadási ellenállás r = 0.92 korrelációs együtthatóval korrelál a sejtszámok változásával, alacsony sejtszámok (< 20) esetén.

8.2.4. CELLAN 4EL - mikrofluidika SU-8-ban, négy integrált elektródával

A kutatás ezen szakaszában olyan mikrofluidikai eszközt terveztem, mely a pontosabb impedancia spektroszkópiai mérések kivitelezése érdekében képes két- és négy-elektródás mérési módszer megvalósítására is. Az előző rendszer tapasztalatai alapján a mikrofluidikai chipet kisebbre terveztem, valamint a csatornákat SU-8-ban alakítottam ki, ezzel kiváltva a kézi illesztést és biztosítva az elektródák pontos illesztését a litográfiai lépések során. Az előző struktúra esetén ugyanis a kézi illesztés bonyolult és időigényes folyamatnak bizonyult. A SU-8-ban kialakított struktúrát egy PDMS fedőelem segítségével lefedve zárt csatornák hozhatóak létre. Továbbá, a sejtek csapdázását a csatorna vertikális szűkítése helyett egy beépített gát kialakításával oldottam meg, melynek a csatornához viszonyított magasságkülönbsége alkalmas a sejtek elektródák közötti csapdázására.

Az adott mérettartományban az impedancia mérés érzékenységét a geometriai jellemzők jelentősen befolyásolják, így annak javítása érdekében az elektródák csapdához képesti elhelyezkedésének vizsgálata került előtérbe. Ennek során különböző elrendezésű platina és arany elektródák jellemzőit vizsgáltam, illetve ezek különböző médiumokkal és sejtes mintákkal való alapos elemzése volt a célom. Az előző mikrofluidikai chipekhez képest a gyártástechnológia annyiban tér el, hogy a csatornák SU-8-ban történő kialakításához elég két litográfiás lépést alkalmazni, mely egyik lépésben létrehozza a gátakat, másik lépésben pedig a csatornákat. A különböző magasságok definiálása az SU-8 2005, 2010, 2025 és 2050 számú, eltérő viszkozitású változatának megfelelő fordulatszámon történő centrifugálásával oldható meg.

Az áttervezett struktúra különböző elektródakialakításokat tartalmaz (43. ábra). A csapdát a megfelelő csatornákban négy elektróda öleli körbe, mely alkalmassá teszi a rendszert két- és négy-elektródás mérések elvégzésére is. Az elektródákat és kivezetéseiket szimmetrikus elrendezéssel terveztem, hogy csökkentsem az esetleges eltérő vezetékhosszúságból adódó impedancia különbségeket. A négy-elektródás mérésnél a két külső elektróda gerjesztőelektródaként, a két belső elektróda mérőelektródaként funkcionál.

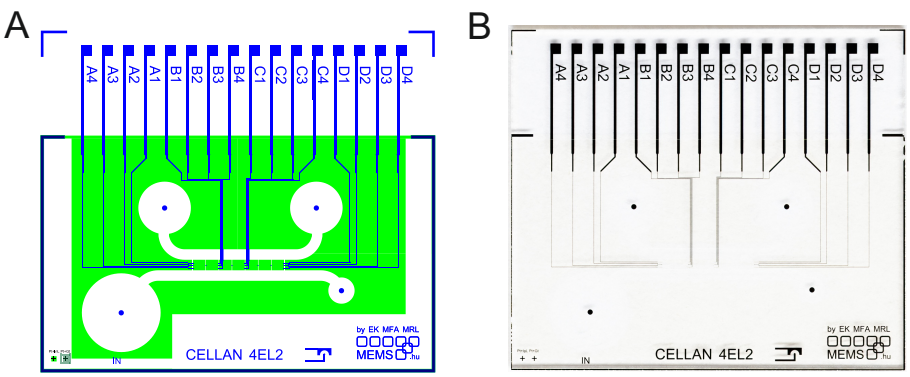


43. ábra. A tervezett mikrofluidikai struktúra SU-8-ban (zöld) kialakítva és a csatorna nagyított képei. Ezek mutatják az elektródák (kék) elrendezését és a központi gátat (sötétzöld), valamint a tervezett elektróda geometriákat.

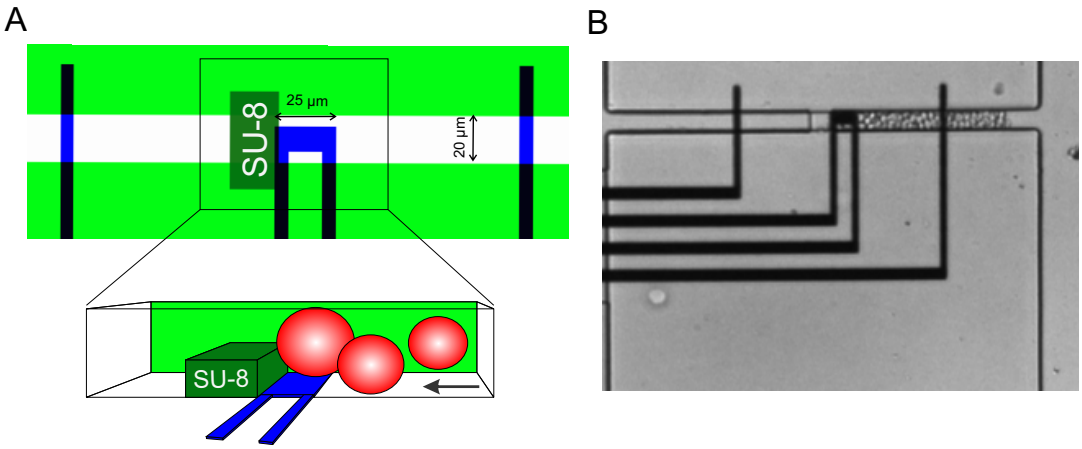
Az elektródák közül a két szélső (gerjesztő elektróda: 1, 4) minden esetben ugyanolyan távolságban helyezkedik el, míg a belső elektródák (mérőelektróda: 2, 3) kialakítására többféle verziót is terveztem: konvencionális egyenes elektródákat (4EL1), a gáthoz közel levő, célzott vizsgálatokra tervezett kialakítást (4EL2), a középső elektródák chipen belüli változó (2, 4, 6, 10 µm) réstávolságával (4EL3), illetve egyet, mely folytonos módon kerül kialakításra (4EL4). Az utolsó esetben (4EL4) az összefüggő középső elektródák fókuszált ionsugaras marással kerültek szétválasztásra, mely segítségével vizsgálható a mikro- illetve nanométeres réstávolságok EIS spektrumra gyakorolt hatása. A tervezett struktúra és az elkészült, 4EL2 platina elektródákat tartalmazó chip a 44. ábrán láthatóak.

Az elkészült chip mérete 13 × 15 mm^2, a főcsatornák szélessége 400 µm, a fő- és keresztcsatornák magassága a felhasznált SU-8 rétegvastagságával állítható, ebből többféle verzió is készült a vizsgálni tervezett sejtmérettől függően: 10, 20, 30, 50 µm, a keresztcsatornák szélessége 20 µm. A bemenet átmérője 3000 µm, a kimenetek átmérője 2000 µm. Ezek kialakítása lyukasztással történik a csatornák feltöltésének érdekében. A keresztcsatornák közepén elhelyezkedő gát 20 µm széles, magassága szintén beállítható, melyet a csapdázandó sejtek és a csatorna méretéhez igazítottam. Élesztősejtek esetén a gát mérete 5 µm volt a 10 µm-es csatornában, humán sejtek esetén 20 µm és 25 µm volt a 30 µm-es csatornában. A sejtcsapdázás sematikus ábrája és egy példa mérés, mely során élesztősejteket csapdáztam a keresztcsatornában, a 45. ábrán látható.

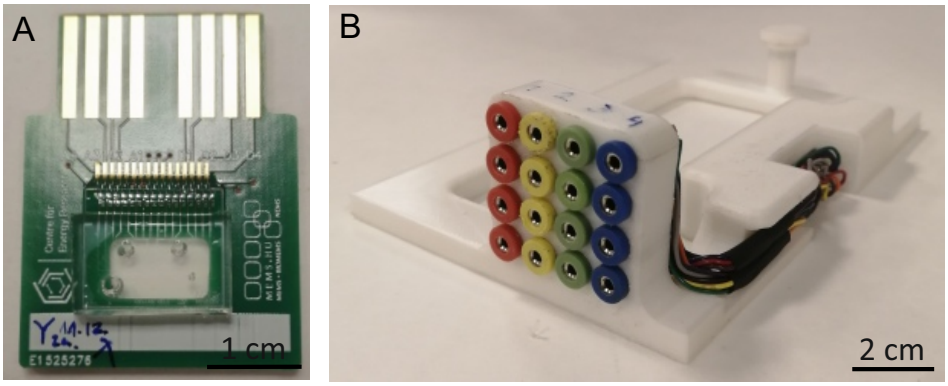
Az elkészült eszköz a NYÁK-ra ragasztott üveghordozóból, a rajta található elektródákból, illetve a hozzá illesztett fluidikai chipből áll. A nyáklap közepén lévő ablak optikai vizsgálatok elvégzését teszi lehetővé az elektromos mérésekkel párhuzamosan. Az új PCB és a hozzá illesztett struktúra az optikai betekintő ablakkal a 46.A ábrán látható. A mikrofluidikai csatornákban található elektródák közötti váltást egy mérési mátrix segíti elő, mely egy házon belüli tervezésű 3D nyomtatott mikroszkópbetétben került kialakításra annak érdekében, hogy az általam használt fluoreszcens mikroszkópba illeszthető legyen (46.B ábra). Ez az elrendezés megkönnyíti a mérések elvégzését, amellett, hogy mechanikailag stabilabb rendszert eredményez.



44. ábra. (A) CELLAN 4EL struktúra az integrált elektródák 4EL2 verziójával és (B) az elkészült chip platina elektródákkal



45. ábra. (A) A sejtcsapdázás megvalósításának sematikus ábrája, a csatorna SU-8-ban (zöld) kialakítva, a csatorna nagyított képe (középen), mely mutatja az elektródák (kék) elrendezését a központi gátat (sötétzöld) és a sejteket (piros). (B) A sejtcsapdázás mikroszkópos képe, mely során a feltöltött csatornában a csapdázott élesztősejtek láthatóak.

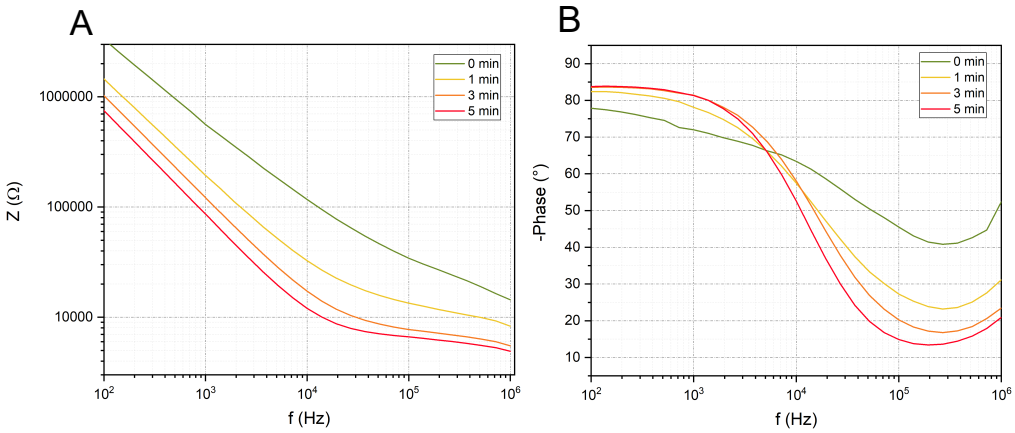


46. ábra. (A) Az erre a célra tervezett NYÁK és a rajta található fluidikai chip és (B) a mikroszkópba helyezhető 3D nyomtatott mintatartó, oldalában a csatornaválasztásra alkalmas mátrixszal.

Az eszköz és a létrehozott chipek funkcionális tesztelése során vizsgáltam a különböző médiumokkal feltöltött mikrofluidikai rendszer EIS spektrumát, mely során először PBS-sel, a későbbi sejtes alkalmazásoknál releváns HepG2 vagy DMEM sejtmédiumokkal, illetve YPD élesztőgomba tápoldattal dolgoztam. A különböző validációs és reprodukálhatósági vizsgálatokra példák a Függelék 15.5. alfejezetében találhatóak. A korábbi sejtcsapdázásra alkalmas fluidikai csatornák 10 µm-ről szűkültek 5 µm-re, szélességük 20 µm volt, mely az élesztősejtek méretéhez volt illesztve. A tesztelés során mikrogyöngyöket és humán sejteket is vizsgálatam, melyhez a csatorna magassága 30 µm-re módosult és 20 µm-re szűkült.

8.2.4.1. A mikrofludikai rendszer feltöltése

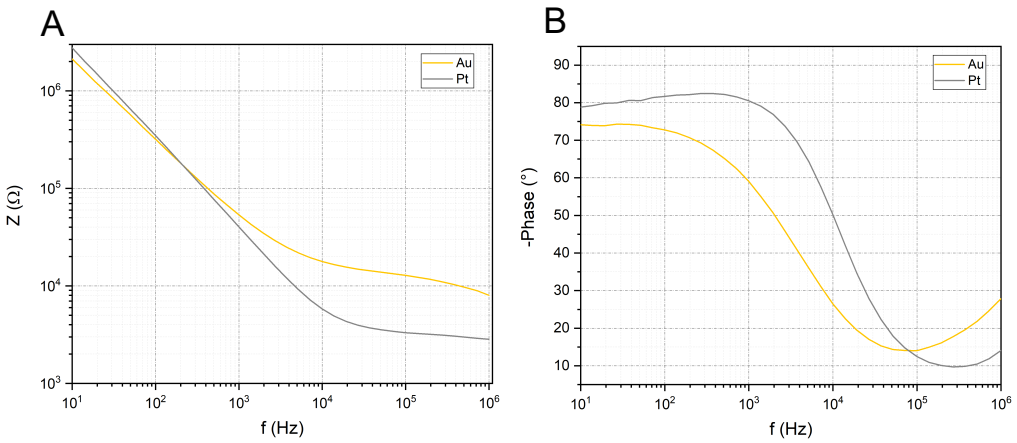
Az elektródák működőképességét előzetes vizsgálatokkal igazoltam és ellenőriztem a chip pontos fluidikai feltöltését és az elektromos jelek megfelelő kialakulását. Ennek során 20 µl fiziológiás sóoldatot használtam. A csatornák feltöltése után a nyomás stabilizálódik a chipen belül, az áramlás lelassul, és az elektromos tulajdonságok is stabilizálódnak. A chip feltöltése után közvetlenül követtem az impedancia alakulását. A mérések során kiderült, hogy az elektromos kettősréteg kialakulásához és a chipben a folyadékáramlás stabilizálódásához nagyjából 5 perc szükséges. Ezután a rendszer hosszabb ideig stabil marad, míg a kimenetek esetleges párolgása meg nem változtatja a nyomásviszonyokat. A 47. ábrán a 10 µm magas keresztcsatornájú 4EL3 típusú Pt elektródákkal rendelkező chip A2-A3 belső elektródái között mért impedancia látható, mely mutatja a kettősréteg kialakulását. A további karakterizációk során az elektromos méréseket a feltöltés után 5 perccel végeztem, mely elegendő idő a rendszer megfelelő stabilizálódásához.



47. ábra. Az elektromos kettősréteg kialakulásának nyomon követése a Bode-digramokon az impedancia abszolút értéke (A) és (B) fázisa esetén.

8.2.4.2. Elektródák anyagának vizsgálata

A kezdeti karakterizáció során vizsgáltam az elektródák anyagának spektrumra gyakorolt hatását. Ehhez fiziológiás sóoldattal végeztem méréseket arany és platina elektródákon. A 48. ábrán láthatóak az EIS görbék arany, illetve platina elektródák esetében. Jól látható, hogy a platina elektródának sokkal kisebb az impedanciája, illetve egyenletesebb a fázisgörbéje, mely az elektróda felület homogénebb elektrokémiai viselkedését, stabilabb kinetikáját és kapacitív tulajdonságait jellemzi. A mérések ismétlése során az arany elektródák szemmel láthatóan elfeketedtek és nem voltak alkalmasak a kísérletek megismétlésére. A mérések után az elektródákat egy Zeiss LEO 1540 XB berendezéssel vizsgáltam, mely alkalmas SEM és EDS mérések elvégzésére is. Az elemzések során fény derült arra, hogy a fiziológiás sóoldat reakcióba léphet az elektródák anyagával, főként az arannyal, kémiai változást okozva azokon, mely az elektróda degradálódásához vezet (49. ábra).

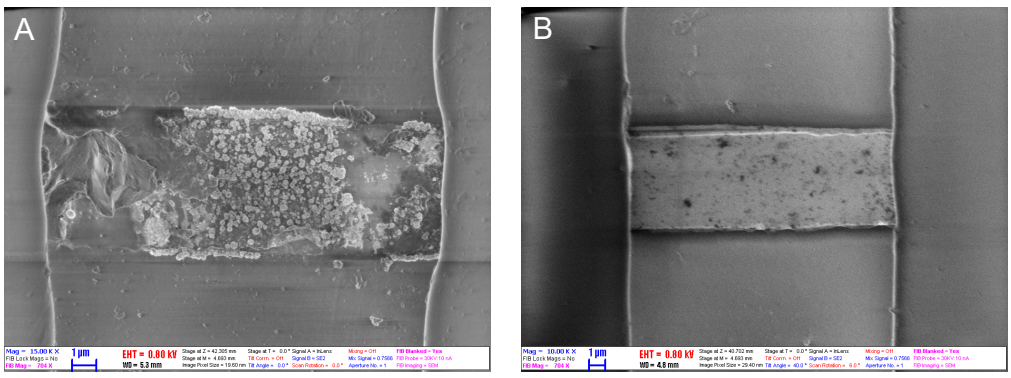


48. ábra. Arany és platina elektródák közötti különbségek Bode-digramokon az impedancia abszolút értéke (A) és (B) fázisa esetén.

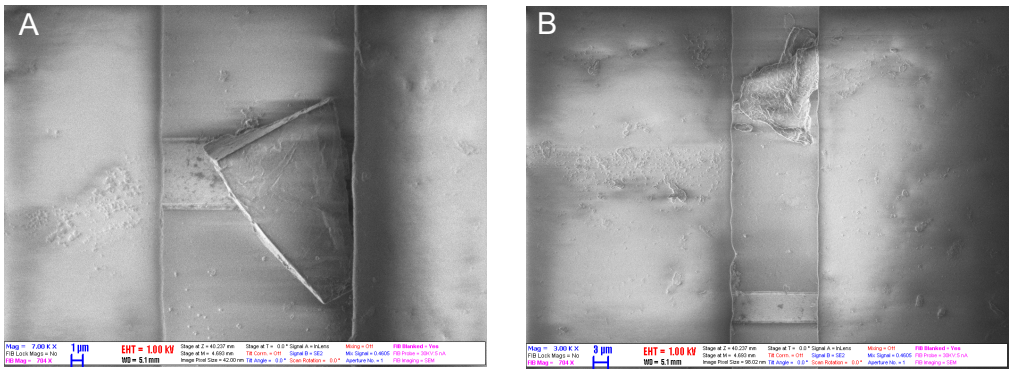
Az EDS mérésekből kiderült, hogy a sóoldatban található nátrium és kálium kiül az elektróda felületére, mely módosítja az oldattal érintkező felület tulajdonságait, ami alkalmatlanná teszi az arany elektródát a további EIS mérések elvégzésére. A platina elektródáknál ilyen jelenséget nem, vagy csak enyhén tapasztaltam. További problémát jelenthet, hogy az oldat cseréjénél sókristályok keletkezhetnek, melyek eltömítik a csatornákat, gátolva az ionáramlást, ami szintén meghiúsítja a méréseket. A csatornákat eltömítő kristályok a 50. ábrán láthatóak.

A degradáció és a sókristályképződés elkerülése érdekében az eszközök további tesztelését fiziológiás sóoldat helyett különböző sejttenyésztéshez használt médiumokkal végeztem, mivel a későbbi biológiai vizsgálatok során hasonló médiumoldatok kerülnek alkalmazásra a chipben.

Általában véve a platina elektródák jobban teljesítettek az arany elektródáknál, mivel ezek nem degradálódnak a mérések során, alacsonyabb az impedanciájuk, a jobbra tolódó és mélyebben futó fázisválaszuk gyorsabb és hatékonyabb elektrokémiai folyamatokat jelez. Az elektródák tulajdonságainak optimalizálása érdekében a tapasztalatok alapján a további új chipek létrehozásánál kizárólag platina elektródákkal dolgoztam.



49. ábra. (A) Az arany és (B) platina elektróda mérés utáni elektronmikroszkópos képei. Jól látható az arany elektróda degradálódása és a platina épsége.

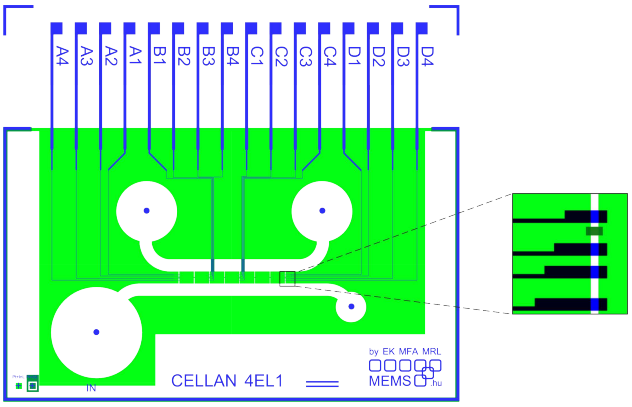


50. ábra. (A) A sejtmédiumból visszamaradt kristály a Pt elektróda felszínén, illetve (B) ahogy elzárja a keresztcsatornát

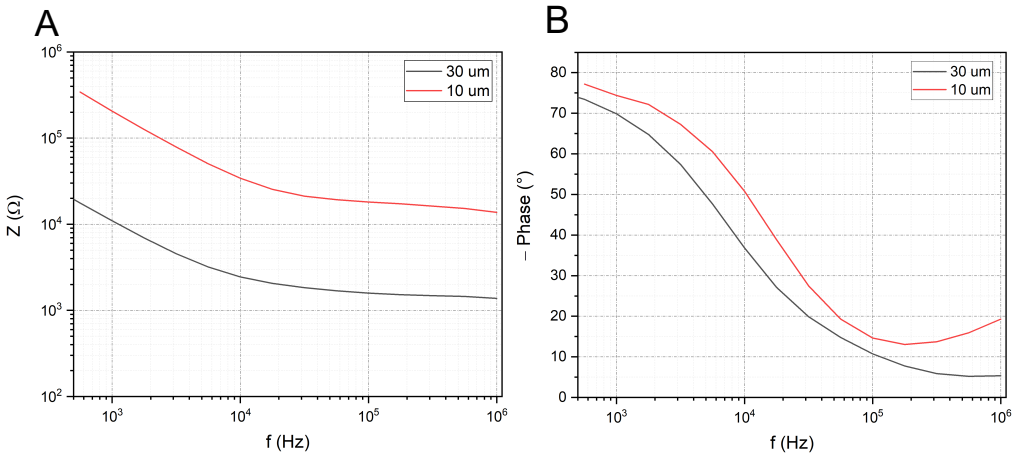
8.2.4.3. Elektróda geometria és elhelyezkedés hatásai a mérésekre

A kezdeti elektródaelrendezés az érzékenység és a stabilitás növelése érdekében módosítottam, az elektródák csatornákba eső részének kiszélesítésével. Ennek során a konvencionális típusú elektróda végződését 5 µm-ről 10 és 30 µm-re szélesítettem. A módosított elektróda elrendezések az 51. ábrán láthatóak. A fluidika feltöltése a CELLAN 4EL chipek esetén minden esetben, a csatornamagasságtól függően 10 vagy 20 µl oldattal történt.

Az elektródák elhelyezésének vizsgálata során különböző szélességű elektródák spektrumait hasonlítottam össze, illetve vizsgáltam az egy csatornában található szélső, illetve belső elektródákon végzett mérések közötti különbséget is. A vizsgálatok során a 10 és 30 µm széles elektródákat vetettem össze. Az elvégzett mérések eredménye az 52. ábrán látható. A szélesebb elektródákon jelentősen kisebb impedancia mérhető, mely a rendszer érzékenységét növeli. Ennek értelmében a további fejlesztés, illetve mérések során a szélesebb elektródákat alkalmazom.

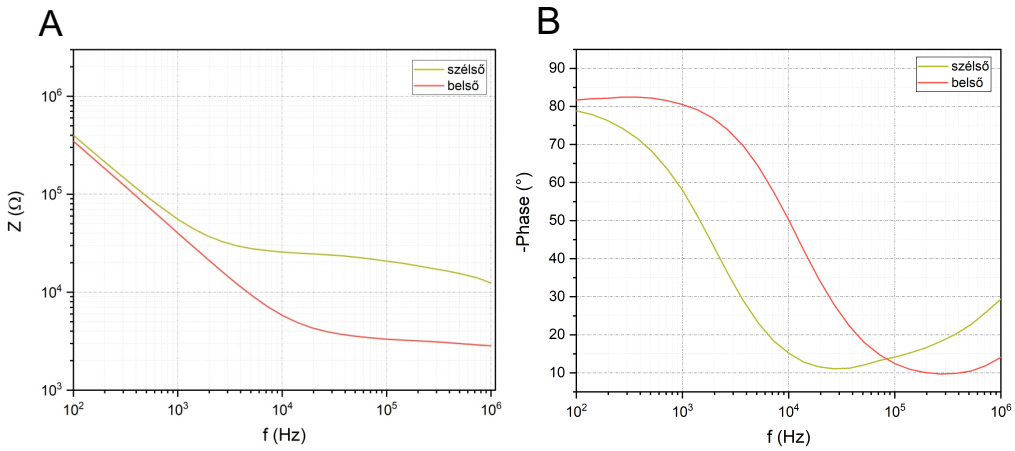


51. ábra. A tervezett CELLAN 4EL mikrofluidikai struktúrák SU-8-ban (zöld) és a csatornák nagyított képei, melyek mutatják az elektródák (kék) módosított elrendezését és a központi gátat (sötétzöld).



52. ábra. Elektródaszélesség hatása az impedancia spektrumra az (A) impedancia abszolút értéke, illetve a (B) fázis esetén.

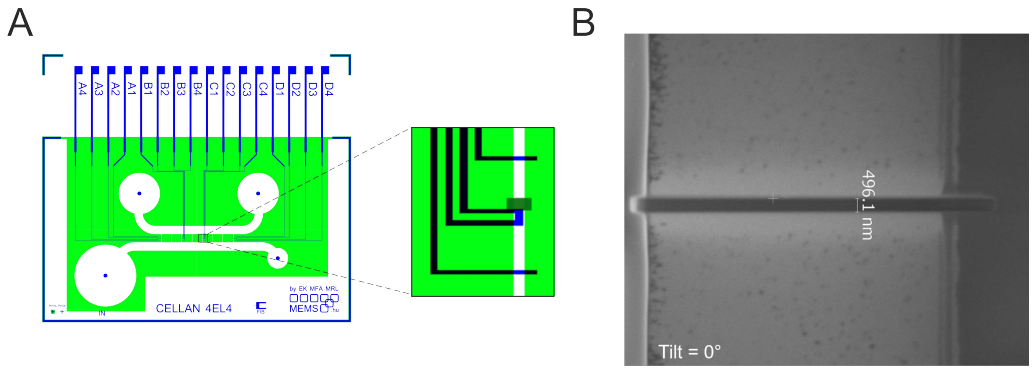
A szélső és a belső elektródákon mért görbék közötti különbség az 53. ábrán látható. A Bode-diagramon látható, hogy a magasabb, kHz feletti frekvenciákon jól elkülönül a két görbe; a belső, közelebb fekvő elektródákon mért impedancia közel egy nagyságrenddel alacsonyabb. A fázidiagramon látható, hogy a belső elektródák görbéje a magasabb frekvenciák felé tolódik, mely a rendszer gyorsabb válaszát eredményezi[61].



53. ábra. A szélső és a belső elektródák impedanciaspektruma közötti különbség

8.2.4.4. Az elektródák távolságának vizsgálata

A kutatás során vizsgáltam a fókuszált ionsugaras marással létrehozott különböző nano-, illetve mikroméretű elektródatávolságok hatását az impedancia spektrumra. A mérő- és gerjesztőelektródákon mért impedanciaspektrumok különbsége alapján a réstávolság csökkentése volt a cél, mely során a struktúra két belső elektródájának szétválasztása fókuszált ionsugaras marással történt. Ennek segítségével akár néhány 100 nm-es rés is létrehozható a két elektróda között. Az elektródák közötti nanoméretű rés csökkentheti a kettősréteg kapacitását, mely eltorzítja az alacsonyfrekvenciás EIS spektrumot.[177,178]



54. ábra. (A) A tervezett mikrofluidikai struktúra SU-8-ban (zöld) kialakítva és a csatorna nagyított képe, mely mutatja az elektródák (kék) elrendezését és a központi gátat (sötétzöld). (B) A FIB-bel kettévágott elektródák SEM képe, melyen látható a vágási felület és a rés nagysága (500 nm).

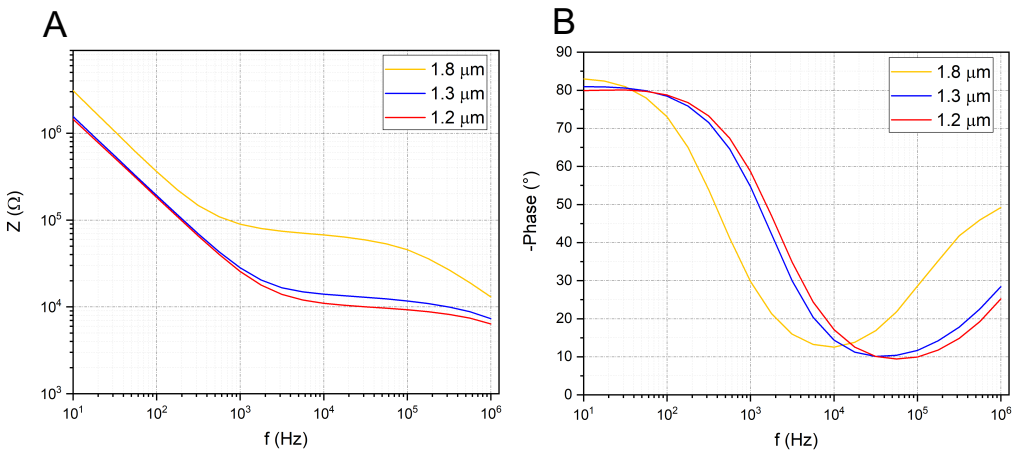
A kísérletek során a 4EL4 chipek arany és platina verzióit is használtam, melyek 10 µm magas csatornákkal és 5 µm magas gáttal rendelkeztek. Ezek a paraméterek alkalmasak az élesztőgombák csapdázására, így ennek köszönhetően a mérések során vizsgáltam a sejtek impedancia spektrumra gyakorolt hatását.

A mikro- és nanorések kialakítása során többféle réstávolságot vizsgáltam: 1.8 μm, 1.3 μm, 1.2 μm, 500 nm és 200 nm. A struktúra kialakítása, a csatornában elhelyezkedő elektródák és az 500 nm-es rés SEM képe az 54. ábrán láthatóak. A chipek vizsgálata során jelentős szerepet játszott az elektródák kivezetésének hossza, így a chipeken az azonos, szimmetrikus kivezetések összehasonlítását alkalmaztam. Ennek során a chipen a két szélső, illetve a két belső elektródán más szélességű réseket hoztam létre. Az elkészült chipeket sejtes médiummal (HEPG2 oldat) és 1 mg/ml koncentrációjú élesztősejtes oldattal töltöttem fel, és vizsgáltam a különböző réstávolságok EIS spektrumra gyakorolt hatását. A réstávolság csökkenésével az impedancia is csökken, mely a mikrorések esetében az 55. ábrán látható. Az ekvivalens áramköri illesztés során az R_{ct} értékek változtak a legnagyobb mértékben (6. táblázat).

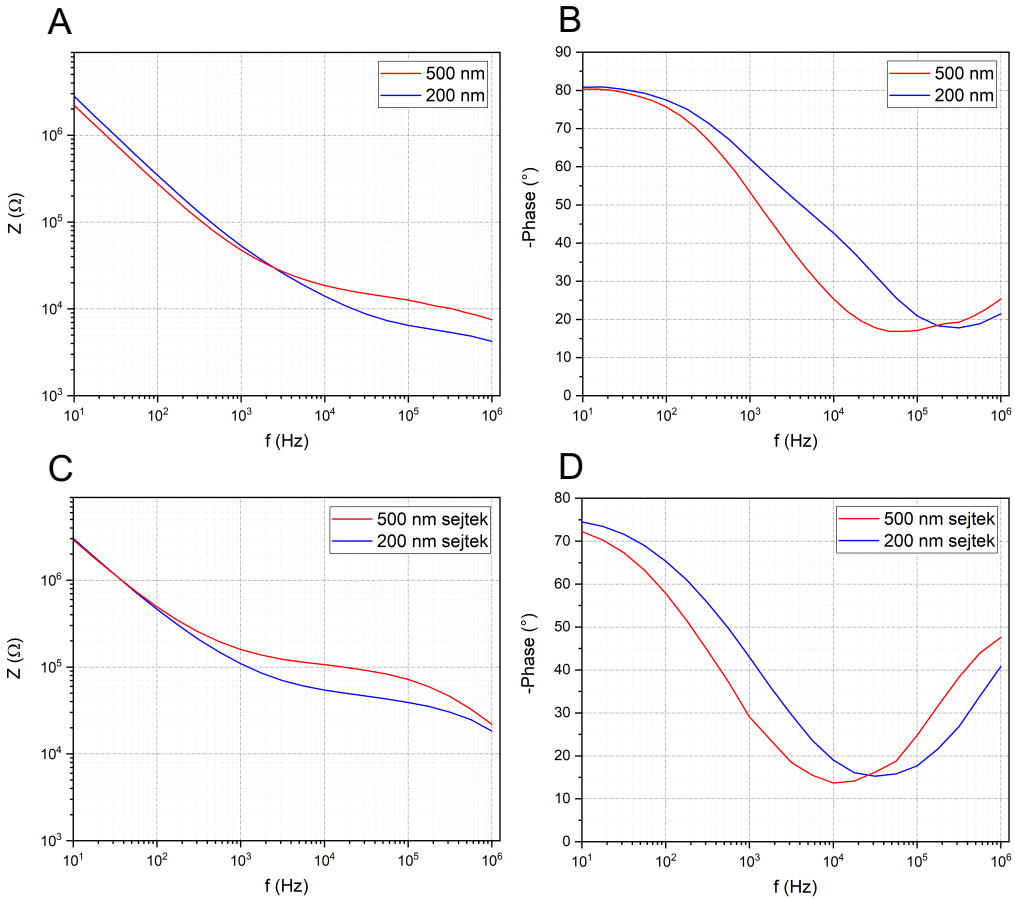
A nanoméretű rések közötti különbség az 56.A és 56.B ábrákon látható. A korábbi tapasztalatokkal megegyezően a kisebb rés nagyobb érzékenységet mutató görbét eredményezett. A mérést élesztőoldattal ismételtem meg, mely során a csapdázott élesztősejtek jól láthatóan megváltoztatják a görbék alakját. A sejtek hatása a spektrumokon az 56.C és 56.D ábrákon látható.

6. táblázat. A réstávolságok és a hozzájuk tartozó illesztett töltésátviteli ellenállások értékei

Réstávolság [µm]	R_{ct} [Ω]
1.2	10790 ± 1.09%
1.3	13700 ± 6.51%
1.8	72370 ± 3.27%



55. ábra. A mikroméretű elektródatávolságok hatása az EIS spektrumra. A csökkenő réstávolság alacsonyabb impedanciát és fázistolódást eredményez.



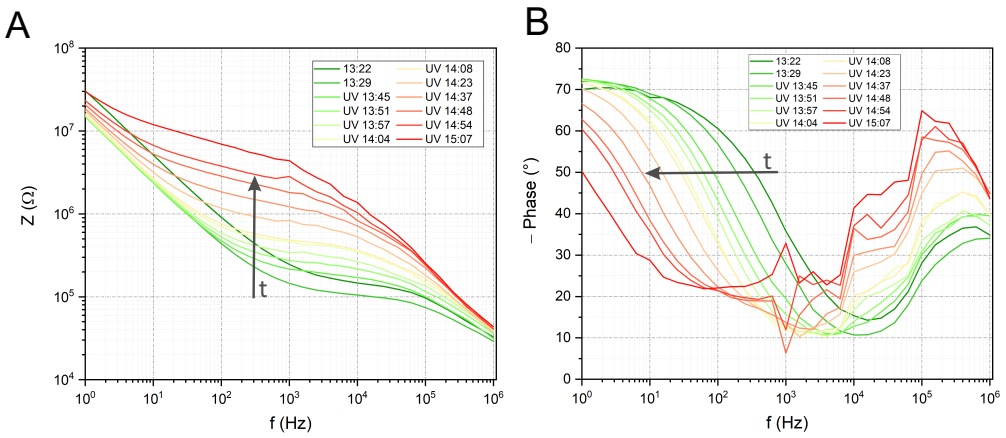
56. ábra. A nanoméretű elektródatávolságok hatása az EIS spektrumra. A csökkenő réstávolság alacsonyabb impedanciát és fázistolódást eredményez.

8.2.4.5. Viabilitási vizsgálatok élesztősejteken

A fejlesztett mikrofluidikai rendszer tesztelése során viabilitási vizsgálatot végeztem csapdázott élesztősejtek segítségével a 4EL2 Pt típusú chipben. A fluidikát 10 µl sejtes oldattal töltöttem fel, ezután az egyensúly beállta után 10 percre UV fény (253.7 nm, 30 W) alá helyeztem az élesztősejtekkel feltöltött chipet, majd több mint másfél órán keresztül párhuzamosan figyeltem a sejtek állapotát optikailag és elektromosan. Az EIS mérésekhez a külső és belső elektródákat egyaránt használtam.

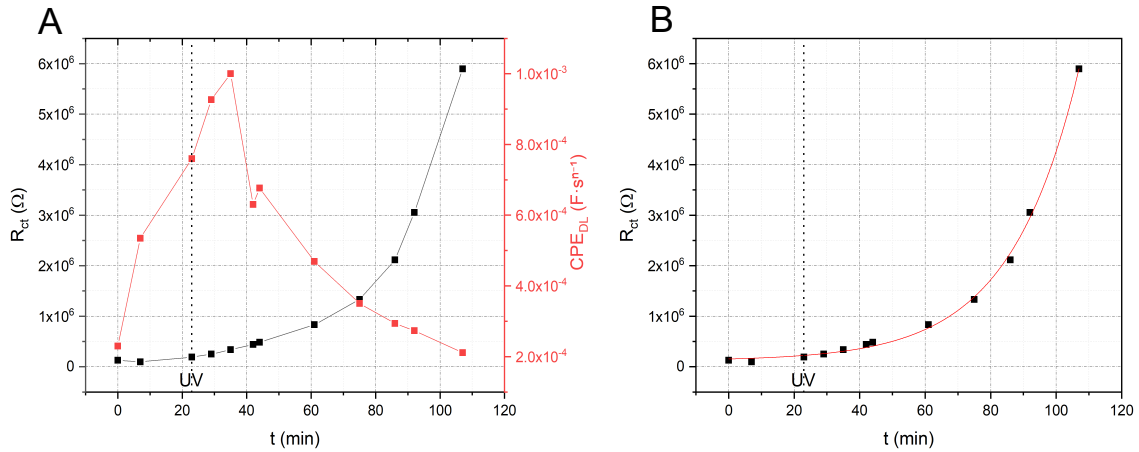
A 253,7 nm hullámhosszú UV besugárzás hatására a csapdázott sejtek elpusztulnak, mely összefügg a sejtek dózisfüggő biológiai válaszával. A 30 W teljesítményű UV-forrás és a 10 perces besugárzási idő alapján a chip felszínére jutó energiasűrűség nagyságrendileg a J/cm^2 tartományba esik. Figyelembe véve a PDMS jelentős UV-elnyelését a 253,7 nm tartományban, a csatornába jutó effektív dózis ennek töredéke, becslésem szerint 10–20 mJ/cm^2 nagyságrendű[179]. Ez a tartomány egybeesik az élesztősejtek UV érzékenységével, ahol már néhány mJ/cm^2 dózis DNS-károsodást idéz elő, míg 10–20 mJ/cm^2 tartományban jelentős sejtpusztulás figyelhető meg[180]. Fontos figyelembe venni, hogy a PDMS az UV sugárzás hatására felületi degradáción megy keresztül, mely során reaktív oxigénfajok és kémiailag aktív komponensek keletkezhetnek. Ezek jelenléte tovább növelheti a sejtek károsodását, így a csatornában tapasztalt sejtpusztulás nem kizárólag a közvetlen UV sugárzás következménye.

Az UV sugárzás hatására az addig stabil spektrum jelentős változáson megy keresztül: az impedancia megnő, míg a fázis elveszíti karakterisztikus formáját, ahogy az a D1-D4 elektródák esetében az 57. ábrán látható. A párhuzamos optikai méréseken látható, hogy a sejtek elpusztulnak, a faluk szétesik, aminek következtében lecsökken a lokális ionkoncentráció a diffúzió miatt. További chipeken és elektróda párokon végzett mérések eredményei a Függelék 15.5. alfejezetében találhatóak.



57. ábra. Élesztősejtek viabilitásának folyamatos vizsgáltata UV besugárzás hatására: ahogy a sejtek meghalnak, a Bode-digaramokon megnő az impedancia és a fázis zajossá válik.

A mérések kiértékelése során a 41. ábrán szereplő módosított Randles féle ekvivalens áramkört használtam modellként. Az adatok lehető legpontosabb illesztése végett a C_{DL}-t CPE-re módosítottam. Az illesztett paraméterek értékei az R_{ct} és a CPE_{DL} esetén a 7. táblázatban, az értékek időbeli változása az 58.A ábrán látható. Az R_{ct} a kezdeti 1.30×10^5 értékéről a sejtek halálával exponenciálisan megnő 5.90×10^6-ra, mely mintegy 45-szörös növekedést jelent (58.B ábra). A CPE értékek is hasonlóan exponenciális csökkenést mutatnak, párhuzamosan az R_{ct} változásával, mely a felületi ionkoncentráció és a kettősréteg változására utal. Ebben az esetben a CPE_{DL} legmagasabb 1.00×10^{-3} [F·s^{n-1}]-ról 2.12×10^{-4} [F·s^{n-1}]-re, mintegy ötödére csökken. A paraméterek jelentős változása lehetővé teheti a sejtek viabilitásának folyamatos követését.

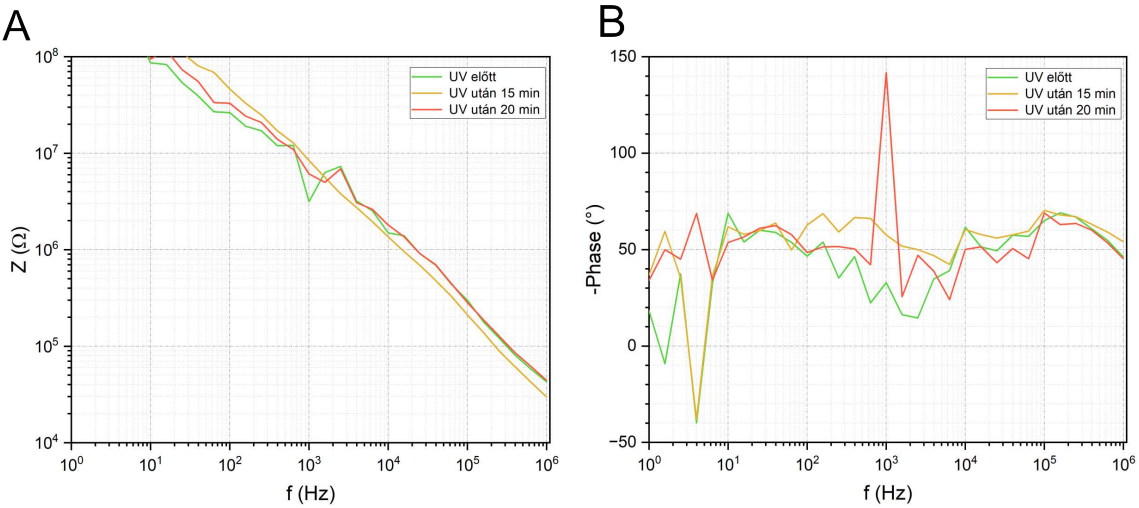


58. ábra. (A) A töltésátviteli ellenállás és a kettősréteg kapacitást helyettesítő CPE változása az UV besugárzást követően és (B) az R_{ct} értékekre illesztett exponenciális függvény ($R^2 = 0.99$)

7. táblázat. Az UV besugárzást követően mért töltésátviteli ellenállás és konstans fázis elem értékei

t [min]	$\boldsymbol{R_{ct}}$ [Ω]	$\textbf{CPE}_{\boldsymbol{DL}}$ [F·s^{n-1}]
0	$1.30 \times 10^5 \pm 3.06\%$	$2.3 \times 10^{-4} \pm 31.55\%$
7	$9.68 \times 10^4 \pm 3.33\%$	$5.35 \times 10^{-4} \pm 34.73\%$
23	$1.90 \times 10^5 \pm 3.40\%$	$7.60 \times 10^{-4} \pm 33.55\%$
29	$2.51 \times 10^5 \pm 3.69\%$	$9.23 \times 10^{-4} \pm 34.18\%$
35	$3.38 \times 10^5 \pm 4.63\%$	$1.00 \times 10^{-3} \pm 33.74\%$
42	$4.40 \times 10^5 \pm 4.00\%$	$6.30 \times 10^{-4} \pm 34.77\%$
44	$4.82 \times 10^5 \pm 4.57\%$	$6.77 \times 10^{-4} \pm 38.57\%$
61	$8.31 \times 10^5 \pm 5.68\%$	$4.70 \times 10^{-4} \pm 40.21\%$
75	$1.33 \times 10^6 \pm 7.64\%$	$3.51 \times 10^{-4} \pm 45.75\%$
86	$2.11 \times 10^6 \pm 10.31\%$	$2.94 \times 10^{-4} \pm 48.53\%$
92	$3.05 \times 10^6 \pm 10.72\%$	$2.73 \times 10^{-4} \pm 43.72\%$
107	$5.90 \times 10^6 \pm 14.57\%$	$2.12 \times 10^{-4} \pm 42.97\%$

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjak arról, hogy a csapdázás és az UV-besugárzás hatására a sejtek által okozott változásokat követem nyomon az impedanciaspektrumokban, megvizsgáltam a sejtek nélküli tápoldat impedanciaspektrumát az UV-besugárzás előtt és után (59. ábra) Az YPD tápoldat impedancia spektruma magas impedanciaértékeket és jelentős fázis ingadozást mutat, mely alacsony ionkoncentrációra és a vezetési mechanizmus kialakulásának hiányára utal.



59. ábra. 4EL2 Pt chip B1-B4 elektródáin mért impedancia változása YPD oldat UV besugárzása hatására.

8.2.4.6. Viabilitási vizsgálatok humán sejteken

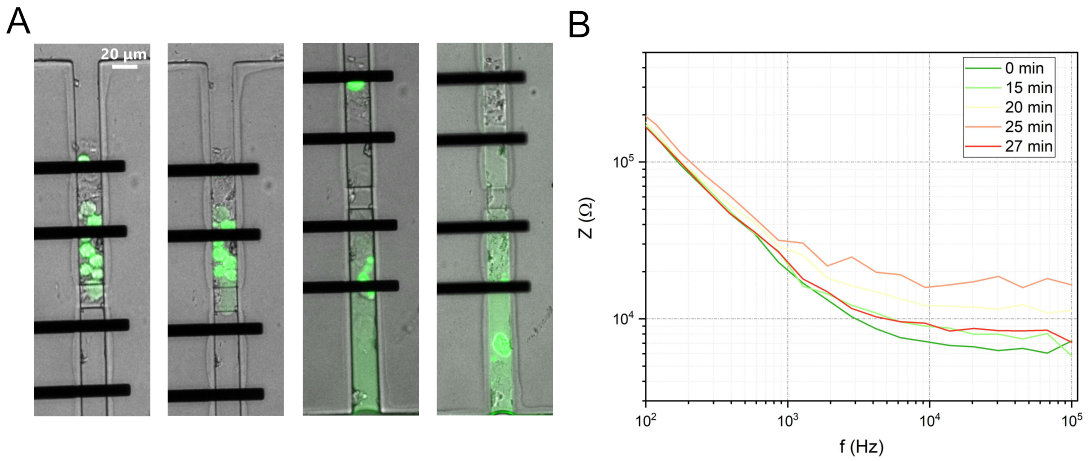
A tevezett rendszer humán sejtekkel való teszteléséhez a 4EL1 Pt chip 5 µm magas gátat és 10 µm magas csatornát tartalmazó verzióját használtam - illeszkedve a sejtméretekhez. A mérésekhez eGFP-vel jelölt, fluoreszcens MES-SA humán méhnyakrákos szarkóma (uterus leiomyosarcoma) sejteket használtam. A sejtek mindaddig termelik a GFP fluoreszcens fehérjét, amíg életben vannak, ezáltal követhető a viabilitásuk. A csatornában csapdázott 9 darab sejt az 60.A ábrán látható.

Hasonlóan az élesztősejtekkel végezett kísérletekhez, 10 percen keresztüli UV besugárzást alkalmaztam. Az emlős sejtek esetében hasonló mechanizmus érvényesül, mint az élesztősejteknél, azonban a válasz gyakran apoptotikus folyamatokon keresztül valósul meg[181]. A 254 nm UV sugárzás közvetlen DNS-károsodást okoz, mely már 1–5 mJ/cm^2 dózisnál kimutatható, míg 10–30 mJ/cm^2 tartományban sejthalál, apoptózis figyelhető meg[182].

Az elektromos mérések során a sejtek eleinte erős fluoreszcens jelet adnak, majd UV besugárzás hatására a jel gyengül és a sejtek szépen lassan elpusztulnak. Ennek első jele a sejtek megnagyobbodása, majd a membránjuk szétesik és a citoplazma a csatornában szétdiffundál. Ez a folyamat szintén nyomon követhető az impedancia spektrumon (60.B ábra). A mérés során fél órán keresztül vizsgáltam mind optikailag, mind elektromosan a sejtek viselkedését, és az impedancia spektrum besugárzást követő változását. Azt a következtetést vontam le, hogy a kezdeti alacsony impedanciájú állapot után a sejtek ioncseréje az oldattal megszűnik, majd csatornában a lokális ionkoncentráció csökkenése miatt megnő az impedancia. A sejtek halálát és a membrán dezintegrációját követően a citoplazma a csatornába jut, mely csökkenő impedanciát eredményez az újból megnövekedett ionkoncentráció miatt.

A 10 µm-es csatornákban a sejteknek kevés helyük van, rugalmasságuknak köszönhetően mégis bepréselődnek és átkúsznak az 5 µm magas gáton, melynek során szétesnek, a citoplazma pedig a csatornába áramlik. A méréssorozat következő lépésében 30 µm magas csatornával és 25 µm magas gáttal dolgoztam. Ebben a konfigurációban nem sikerült a sejtcsapdázás, mert a 30 µm magas csatornában nagyobb az áramlási sebesség a kezdeti feltöltésnél, mely átnyomja a sejteket a gáton, ahol azok azonnal szétesnek.

A struktúra humán sejtes alkalmazásra való továbbfejlesztése a sejtcsapdázás megoldása és baktériumsejtek csapdázása jövőbeli terveim között szerepel.



60. ábra. A csapdázott MES-SA sejtek viabilitásának időbeli követése UV besugárzás után (A) optikai és (B) elektromos módszerrel

[T3] Közvetlenül SU-8-ban kialakított csatornákat és csapdaszerkezeteket, illetve integrált elektródákat tartalmazó mikrofluidikai rendszert hoztam létre, mely képes sejtcsoportok viabilitásának párhuzamos optikai és elektromos nyomon követésére. [C5] [C9]

(i) Az integrált elektródák anyagának, geometriájának és elhelyezkedésének optimalizálásával javítottam az impedancia mérésen alapuló analitikai rendszer érzékenységét. Megmutattam, hogy a Pt elektródák alkalmazása javítja a rendszer hosszú távú stabilitását, az elektródák felületének növelése és távolságuk csökkentése javítja a töltésátadási ellenállást.

(ii) 10^6 sejt/ml koncentrációjú S.cerevisiae élesztő sejteket tratalmazó oldat esetén elektrokémiai impedancia spektroszkópiával vizsgáltam a sejtéletképesség UV besugárzás hatására történő változását és igazoltam, hogy a rendszer alkalmas a viabilitás elektromos követésére az ekvivalens áramköri illesztés paramétereinek változását felhasználva. Megállapítottam, hogy az élesztősejtek viabilitásának csökkenése a töltésátadási ellenállás jelentős növekedését, illetve a kettősréteg kapacitást jellemző konstans fáziselem csökkenését okozta.

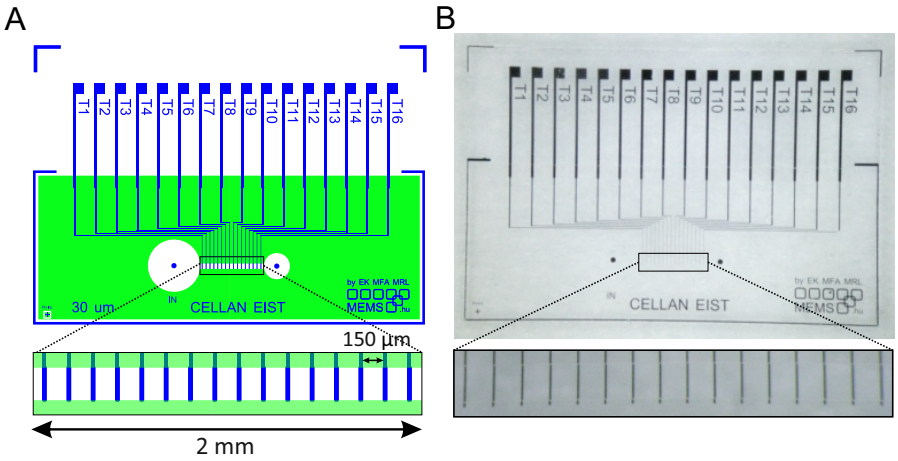
(iii) Humán rákos MES-SA sejtek vizsgálata esetén megállapítottam, hogy a mikrofluidikai eszköz megfelelő geometriai adaptáció után az optikai és az elektromos módszerek kombinációjával alkalmas a sejtek halálának nyomon követésére.

9. Egyéb fejlesztési irányok

9.1. Elektromos Impedancia Tomográfia

Az előzőekben bemutatott elektromos mérési módszer sejtanalitikai alkalmazhatósága további felhasználási irányok felderítésére motivált. A kutatás kiterjesztéseképp célom olyan eszköz fejlesztése volt, melyben több párhuzamos elektróda elhelyezésével megvalósítható sejtek mikrofluidikai csatornán belüli eloszlásának meghatározása. Ez az impedancia tomográfia mikrofluidikai megvalósítási lehetőségét vetíti előre. Ez a megközelítés új irányt kínál a technika korlátainak csökkentésére és a kvantitatív kiértékelés felé való elmozdulásra. A kutatást az ÚNKP és EKÖP pályázatok keretében, valamint a Pécsi Tudományegyetem közreműködésével végeztem.

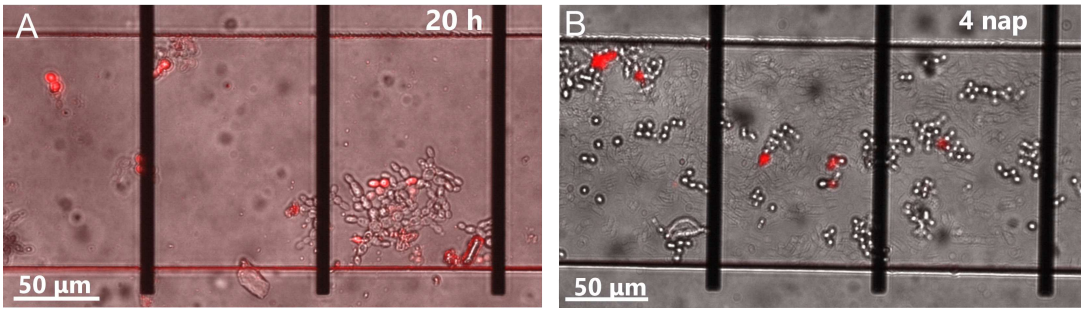
A gyártástechnológia megegyezik a 8.2.4. fejezetben tárgyaltakkal. A mikrofluidikai struktúra SU-8-ban került kialakításra, ezért a csatorna szintén egy PDMS fedőelemmel zártam le. A mikrofluidikai rendszer egy 2 mm hosszú központi főcsatornát tartalmaz. A csatorna alján 16 darab platina elektróda található, melyek egyenlő távolságra, egymástól 150 µm-re helyezkednek el. A rendszer érzékenységének vizsgálatára különböző méretű elektródákat terveztem, melyek 10 µm, 30 µm és 50 µm szélességűek voltak. A csatorna magassága a litográfiai lépések során a vizsgált részecskeméretnek megfelelően módosítható, mely a megfelelő SU-8 rétegvastagság kiválasztásával érhető el. A mérések során a csatornamagasságok 10 µm, 30 µm, valamint 50 µm voltak. Az elektródaelrendezés geometriai kialakítása szimmetrikus és egyenlő távolságú, mely alkalmassá teszi a chipet impedanciaspektroszkópiai alkalmazásokhoz. A kész mikrofluidikai chip mérete 15×10 mm^2. A tervezett mikrofluidikai csatornát és a beágyazott elektródákat az 61.A ábra mutatja, a legyártott chip pedig az 61.B ábrán látható. A mérések során a 8.2.4. fejezetben alkalmazott NYÁK-kal és csatornaváltó mátrix-szal dolgoztam.



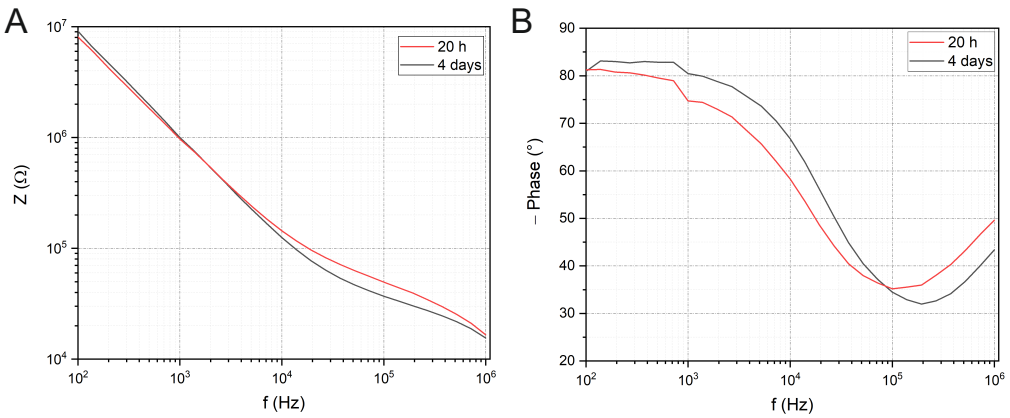
61. ábra. A tervezett (A) és a megvalósított (B) EIT chip: a mikrofluidikai layout (zöld), illetve a csatornák nagyított képei, melyek mutatják az elektródák (kék) elrendezését

9.1.1. Biokompatibilitás vizsgálata

A mikrofluidikai rendszer biokompatibilitását élesztősejtek életképességének optikai és elektromos nyomon követésével vizsgáltam. A mikrofluidikai chipet feltöltöttem élesztősejteket tartalmazó YPD médiummal, majd egy Petri-csészében lezárva inkubátorba helyeztem a megfelelő hőmérséklet fenntartásához. Az élesztőpopuláció növekedését 20 óra, majd 4 nap elteltével EIS mérésekkel és fluoreszcens spektroszkópiával kísértem figyelemmel. A sejtek proliferációja egyértelműen megfigyelhető mind az optikai felvételeken (62. ábra), mind az EIS spektrumokon (63. ábra), míg a sejtek életképességét propidium-jodid festés alkalmazásával vizsgáltam. Az ekvivalens áramköri illesztéssel meghatározott R_s és R_{ct} értékek a 8. táblázatban láthatóak. A paraméterek növekedése nagyobb ionkoncentrációra utal, ami a sejtek szaporodásának következménye. A rendszer ily módon alkalmas sejtpopulációk vizsgálatára.



62. ábra. Az élesztőpopuláció viabilitásának optikai monitorozása propidium-jodiddal 20 óra és 4 nap elteltével



63. ábra. Az élesztőpopuláció impedancia spektruma 20 óra és 4 nap elteltével.

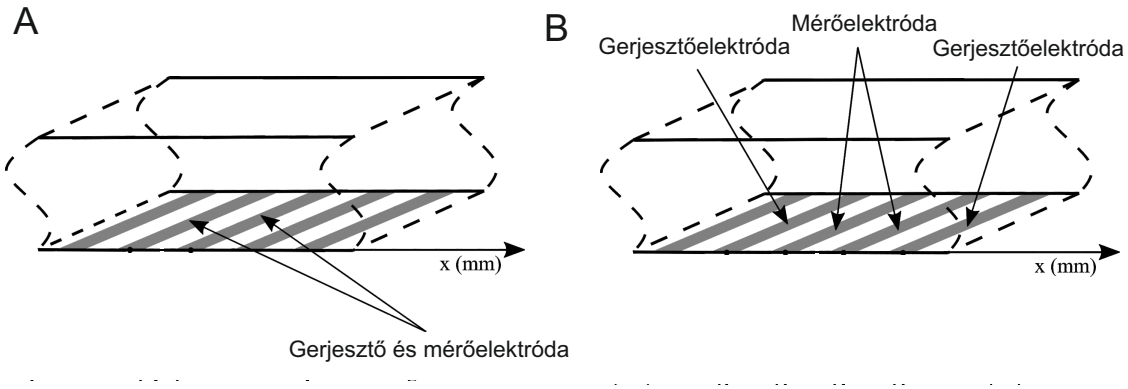
8. táblázat. Az oldat ellenállásának, illetve a töltésátviteli ellenállás változása 20 óra és 4 nap elteltével

Δt	R_s [kΩ]	R_{ct} [kΩ]
20 h	10.04 ± 1.12	51.6 ± 2.46
4 nap	8.29 ± 1.14	30.5 ± 1.59

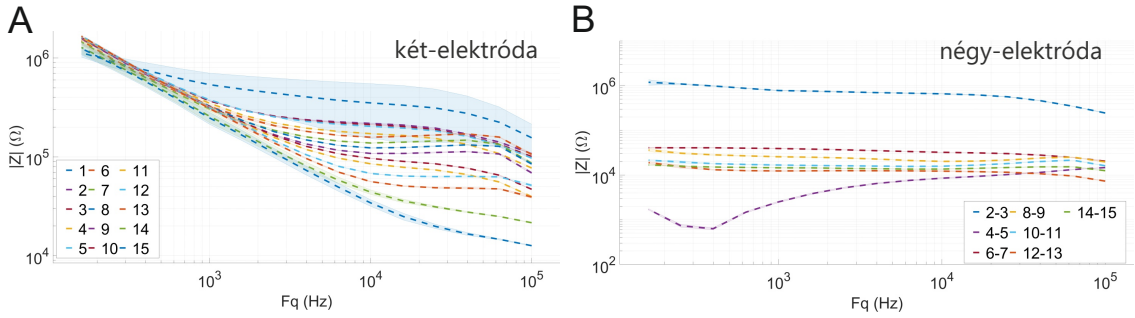
9.1.1.1. Két- és négyelektródás mérési módszerek összehasonlítása

A rendszerben található multi-elektródás elrendezés alkalmas a csatorna helyfüggő leképezésére. A két- és négyelektródás mérési módszer összehasonlításához 10 µm magas csatornát használtam, melyet 0.01 M koncentrációjú PBS oldattal töltöttem fel. A mérések során a csatornát teljes hosszúságában elektromosan végigszkenneltem, kételektródás módszer esetén minden két szomszédos elektróda között, négyelektródás mérési módszer esetén négy szomszédos elektróda között mértem (64. ábra).

A két- és négyelektródás mérések közötti különbség különösen az 1000 Hz alatti régióban figyelhető meg az impedancia spektrumon és a fázisdiagramon, ahogy az a 65. ábrán is látható. Ezen a tartományon a kételektródás mérés esetén az elektródák felületén lejátszódó folyamatok hatásai, mint például a jelentős kontakt impedancia, erőteljesen befolyásolják a spektrumok lefutását. A négyelektródás architektúra alkalmazásával ezek a jelenségek kiküszöbölhetők, ami összhangban van az irodalomban fellelhető megfigyelésekkel. Ez a mérési eljárás ígéretes vizsgálati módszert jelenthet sejtek beható vizsgálatához.



64. ábra. A két- (A) és négyelektródás (B) mérési módszerek esetén a mérő- és gerjesztőelektródák helyzetei.

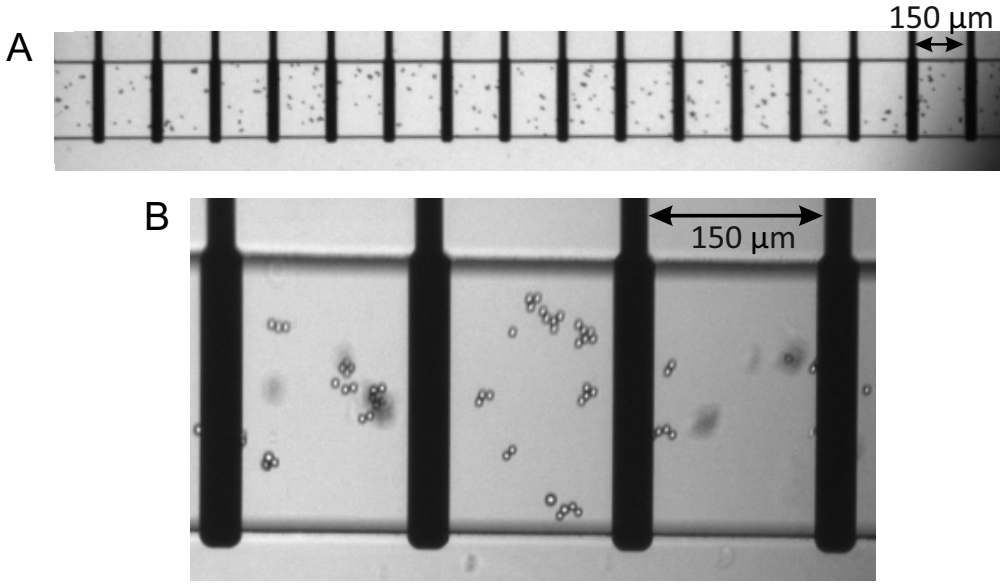


65. ábra. A két- (A) és négyelektródás (B) mérések spektrumai a csatorna szekvenciálisna elhelyezett elektródák segítségével történő elektromos pásztázása esetén

9.1.1.2. Mikrogyöngyök lineáris leképezése

Az eszköz lineáris leképezésének vizsgálatához 10, 30 és 50 μm magas csatornákban vizsgáltam a mikrogyöngyök jelenlétének hatását az impedancia spektrumra. A mérésekhez 6 μm átmérőjű, 600-650 nm tartományon emittáló (pink) fluoreszcens polisztirol mikrogyöngyöket használtam. A mikrogyöngy oldatot a kereskedelmi forgalomban kapható törzsoldat (2 ml, 1,0 tömeg% w/v) PBS-sel történő négyszeres hígításával készítettem el. A gyöngyök nélküli PBS referencia mátrixként szolgált.

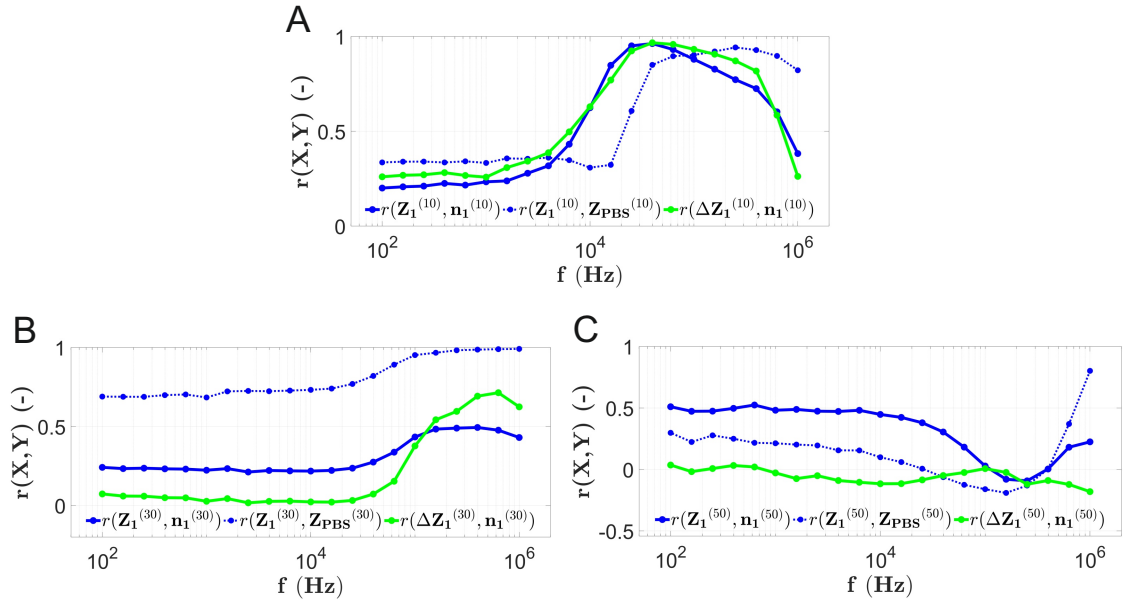
A mérések során a csatornát 5 μl mikrogyöngy oldattal töltöttem fel. Az áramlás eloszlatta a mikrogyöngyöket a csatornában az elektródák között (66.A ábra). A nyomáskülönbség kiegyenlítődése és az áramlás megszűnése után a véletlenszerűen kialakult mikrogyöngy-eloszlás rögzítésre került a bemeneti és kimeneti nyílásokra cseppentett paraffinolaj segítségével. Az olaj lezárja a nyílásokat és megakadályozza a további párolgást vagy áramlást, mely a gyöngyöket elmozdítaná a csatornán belül. Ennek köszönhetően a gyöngyök eloszlása a mérés teljes időtartama alatt állandó maradt a csatornában. Az elektromos mérések megkezdése előtt a csatornákban lévő mikrogyöngyökről optikai felvételek készültek (66.B ábra), melyek segítségével meghatározható a gyöngyök eloszlása. A gyöngyök száma manuálisan leszámolható az egyes elektródák között, mely így alkalmas a gyöngyök jelenléte és az EIS spektrumban történő okozott változás közötti összefüggés vizsgálatára. A magasabb csatornák vizsgálata során több kép készült különböző fókuszsíkban a gyöngyök számának pontos meghatározásához.



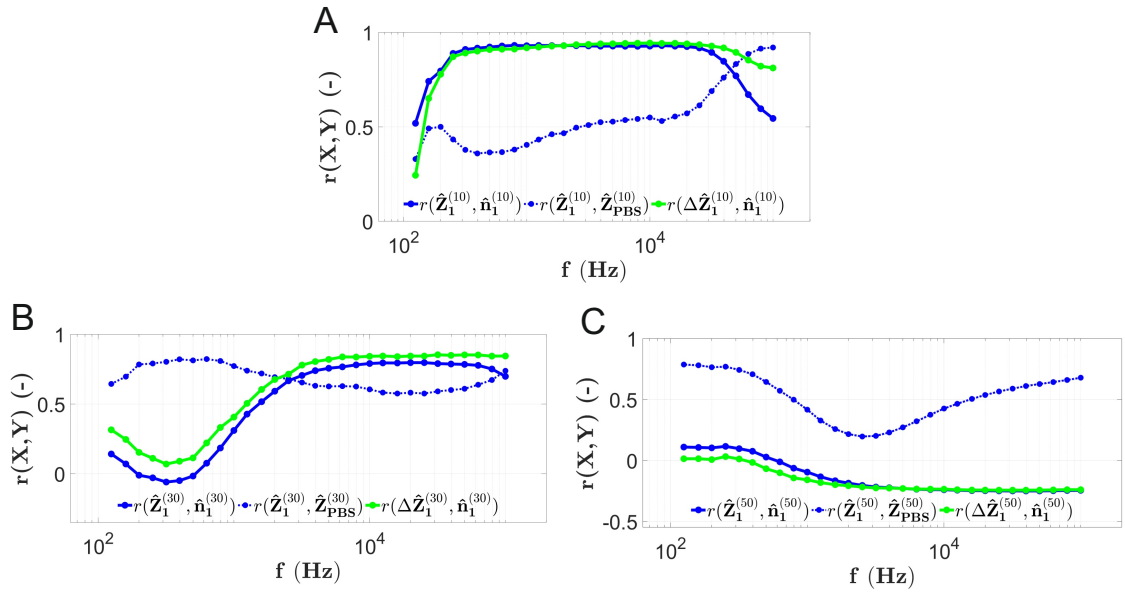
66. ábra. (A) A mikrogyöngyök eloszlása a csatorna teljes hosszán és (B) az elektródák közötti nagyított kép, mely mutatja a gyöngyök elektródák közötti eloszlását.

A feltöltést követően minden szomszédos elektródapár között felvettem az impedancia spektrumokat két- és négy-elektródás mérési módszerrel 100 Hz – 1 MHz frekvenciatartományon, és vizsgáltam, hogy az elektromos mérés milyen összefüggésben van az elektródák közötti gyöngyszámmal. Az adatok feldolgozása során korrelációt kerestem a gyöngyszám és a mért impedancia nagysága között. Ehhez az adatokat vektorokba, illetve mátrixokba rendeztem, ahol **n** tartalmazza az elektródák közötti mikrogyöngyszámokat, **Z** és $\hat{\mathbf{Z}}$ pedig a mért impedancia spektrumokat két-, illetve négyelektródás mérési módszer esetén. A mátrixok elemeinek sorrendje megegyezik a csatornában található elektródák közötti mérések sorrendjével, ahol $\mathbf{Z} \in \mathbb{C}^{21\times15}$ és $\hat{\mathbf{Z}} \in \mathbb{C}^{30\times13}$ egyenként tartalmazzák az adott számú frekvencián felvett EIS spektrumokat. A referencia mérések gyöngyök nélküli PBS oldattal történtek ($\mathbf{Z_{PBS}}$, $\hat{\mathbf{Z}}_{\mathbf{PBS}}$), mely segítségével a gyöngyös mérések korrigálhatóak, ezáltal az adatok tisztán tükrözik a mikrogyöngyök jelenlétének befolyását a spektrumra. A korrigált spektrumok kételektródás mérés esetén a $\Delta\mathbf{Z} = \mathbf{Z} - \mathbf{Z_{PBS}}$ összefüggés, négyelektródás esetben a $\Delta\hat{\mathbf{Z}} = \hat{\mathbf{Z}} - \hat{\mathbf{Z}}_{\mathbf{PBS}}$ alapján számolható. A mikrogyöngyszám és az impedancia, valamint a korrigált impedancia kapcsolatának jellemzésére a Pearson-féle korrelációt használtam (r)[183].

A mért adatok rendezése, kiértékelése, ábrázolása és a korreláció meghatározása MATLAB segítségével történt. A korrelációk különböző csatorna magasságoknál a kételektródás módszer esetén a 67. ábrán, négyelektródás mérések esetén a 68. ábrán láthatóak. A grafikonokon a kék görbe az impedancia és a mikrogyöngyök számának, a kék pontozott görbe a gyöngyös oldat és a referenciaoldat, a zöld görbe pedig a korrigált impedancia és a gyöngyszám korrelációs együtthatóját mutatja a frekvencia függvényében.



67. ábra. A mikrogyöngy-eloszlás és a mikrogyöngyös, illetve PBS-sel végzett kételektródás mérések közötti korrelációs együtthatók: (A) 10 µm, (B) 30 µm és (C) 50 µm csatornamagasság esetében.



68. ábra. A mikrogyöngy-eloszlás és a mikrogyöngyös, illetve PBS-sel végzett négyelektródás mérések közötti korrelációs együtthatók: (A) 10 µm, (B) 30 µm és (C) 50 µm csatornamagasság esetében.

A mérések alapján megállapítható, hogy minél jobban közelíti a mikrogyöngy átmérője a csatorna átmérőjét, annál magasabb a korreláció. A négyelektródás méréseknél szélesebb frekvenciatartományon (500 Hz – 50 kHz) magas a korreláció (>0.9), míg a kételektródás módszer esetén szűkebb ez a tartomány (30 kHz - 300 kHz). A nagyobb csatornamagasságok esetében gyengébb korrelációt mutattak az adatok egymással. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a csatornamagasság részecskeméretthez való igazításával, illetve a négyelektródás mérési módszer alkalmazásával vizsgálható a legjobban a részecskék számának impedancia spektrumra gyakorolt hatása.

A fejlesztett módszer megfelelő méretparaméterek, mérési módszer és tartomány esetében alkalmas a csatorna elektromos leképezésére és a részecskék detektálására, így a kutatás folytatásában a rendszer akár humán sejtek vizsgálatára is alkalmas lehet, ami a későbbiekben gyógyszerhatóanyag tesztek lehetőségét vetíti előre.

ÖSSZEGZÉS

Az impedancia tomográfia mikrofluidikában való megvalósításához olyan rendszert terveztem, mely egyenlő távolságra lévő elektródákat tartalmaz, ezáltal alkalmassá válik a csatorna lineáris leképezésére. A kísérletek során vizsgáltam az élesztősejtek viabilitásának négy nap utáni változását, és megállapítottam, hogy a struktúra alkalmas lehet sejtek hosszútávú vizsgálatára. Vizsgáltam továbbá a két-, és négyelektródás mérési módszerek hatékonyságát a lokális impedancia spektrumok és a részecskeszámok közötti összefüggések meghatározásában. A négyelektródás vizsgálati módszer előnyt jelenthet a kételektródáshoz képest, mivel a mérési összeállításból kifolyólag nem befolyásolják jelentősen az elektródák felületi tulajdonságai. A csatorna lineáris leképezésének vizsgálatához mikrogyöngyöket juttattam a struktúrába, és vizsgáltam az egyes elektródák között elhelyezkedő mikrogyöngyök számának impedancia spektrummal való korrelációját, illetve három csatornamagasság (10, 30 és 50 μm) esetén a gyöngyök méretének és a csatorna magasságának spektrumra gyakorolt hatását. A mérések alapján a csatornamagasság részecskeátmérőhőz való közelítése növeli a korrelációt az impedanciamenet és a gyöngyök lokális eloszlása között. A négyelektródás mérési módszer szélesebb frekvenciatartományon biztosított pontosabb leképezést.

10. Összefoglalás

Kutatómunkám fókuszában egy olyan mikrofluidikai cella tervezése és kísérleti vizsgálata állt, mely alkalmas sejtpopulációk és egyedi sejtek csapdázására, kontrollált kémiai környezet kialakítására, valamint különböző hatóanyagok célzott injektálására és azok in vitro hatásainak nyomon követésére optikai és elektromos módszerek együttes alkalmazásával. A kutatás során olyan applikáció-specifikus integrált mikrofluidikai és érzékelőrendszeren alapuló eszközt fejlesztettem, mely lehetővé teszi a sejtpopulációk fenntartását, kémiai kezelések végrehajtását és a sejtek élettani viselkedésének valós idejű monitorozását. Az optikai vizsgálatokat fluoreszcens mikroszkópiával, az elektromos méréseket elektrokémiai impedancia spektroszkópiával végeztem, mely non-invazív és jelölésmentes módon szolgáltat valós idejű információt a sejtek állapotáról.

A kémiai gradiens kialakításának vizsgálatára olyan rendszert terveztem, mely stabilan képes nyomon követni a fluoreszcens molekulák diffúzióját, ezáltal demonstrálva a mikrofluidikai struktúrába juttatott hatóanyagok koncentrációeloszlásának kontrollját. A sejtpopulációkra szabott hatóanyagtesztek mikrofiziológiai rendszerekben történő megvalósításához elengedhetetlen a bejuttatott hatóanyagok koncentrációjának és eloszlásának vizsgálata. Az általam fejlesztett módszer lehetőséget teremt a hatóanyagterjedés mikrofluidikai rendszerben történő térbeli és időbeli követésére.

A rendszer további fejlesztése során megvalósítottam különböző sejtek hidrodinamikai csapdázását (élesztő, MES-SA). A csatornán belül integrált elektródákkal elektrokémiai impedancia spektroszkópiai méréseket végeztem a lokalizált sejtek számának, lokális eloszlásának és viabilitásának nyomon követésére, Az eredményeket párhuzamos optikai mérésekkel támasztottam alá. Az általam fejlesztett eszköz lehetőséget teremt különböző sejtek non-invazív, valós idejű vizsgálatára és utat nyithat az elektromos méréstechnikával kombinált kompakt mikrofluidikai rendszerek fejlesztése felé. Ez számos területen előrelépést jelenthet, mint például a betegségmechanizmusok, terápiás lehetőségek Organ-on-Chip rendszerekben végzett kutatása, vagy az antibiotikum szuszceptibilitás mikrofluidikai környezetben való gyorsított elemzése terén. A felvázolt mikrofiziológiai, vagy a komplexebb Organ-on-Chip rendszerek olyan kísérleti platformok, melyek lehetővé teszik élő sejtek vagy szövetek laboratóriumi fenntartását és integrált szenzorokkal történő folyamatos monitorozását. A remények szerint ezek az új fejlesztések képesek lesznek az emberi biológia megértésére és az új gyógyszerek tesztelésére irányuló kísérletek felgyorsítására.

A PhD dolgozatban bemutatott eredmények közvetlenül hasznosultak az INBIOM (TKP2021-EGA-04) projekt fejlesztéseiben. A projekt során a közvetlen célunk olyan kompakt, moduláris mérési elvek demonstrálása, melyek lehetővé teszik sejtpopulációk közvetlen vizsgálatát - akár gyógyszerhatóanyagtesztek során is. A vizsgált sejtek detektálása, viselkedésük és életképességük követése integrált szenzorok alkalmazásával tovább egyszerűsítheti ezeket a hatóanyagteszteket. Az általunk fejlesztett optikai és elektromos mérési (EIS, EIT) módszerek képesek támogatni a terápia tervezését (pl. gyógyszerrezisztencia vizsgálatok) vagy akár a személyre szabott terápiák kialakítását.

11. Új tudományos eredmények - Tézisek

[T1] Szabad molekuladiffúzió vizsgálatára alkalmas mikrofluidikai rendszert terveztem és alakítottam ki, mely lehetővé teszi fluoreszcens molekulák diffúziós állandóinak optikai detektáláson alapuló meghatározását, az időben változó koncentráció gradiens profil követésével és elemzésével.
[P1] [C2] [C3]

(i) A mikrofluidikai rendszer szerkezete egyedülálló módon, akadályok és membránok nélkül teszi lehetővé szabad molekuladiffúzió vizsgálatát. Megmutattam, hogy az általam tervezett architektúra – megfelelő mérési protokoll mellett – biztosítja az állandó felületi koncentráció kialakulását a főcsatornában, lehetővé téve a komplementer hibafüggvény alkalmazását a diffúziós folyamat matematikai leírására. A szimmetrikus csatornarendszer, a nagy (7mm) átmérőjű bemeneti nyílások és a jelentős hidrodinamikai ellenállással rendelkező – 10µm (m) x 6µm (sz) x 800µm (h) – mintainjektáló kapillárisok csökkentik a hidrosztatikai nyomáskülönbségekből adódó konvektív hatásokat.

(ii) Megmutattam, hogy a fejlesztett eszköz és módszer megbízhatóan alkalmas lokális optikai zajt létrehozó folyamatok (pl. fehérje aggregáció) hatásainak kiküszöbölésére és lehetővé teszi fehérjék diffúziós állandóinak gyors, 10 percen belüli mérését.

(iii) Az optikai mérés kiértékeléséhez fejlesztett Python programkód alkalmazásával meghatároztam három, különböző nagyságrendbe eső tesztmolekula – BSA, IgG és RhB – diffúziós állandóit, melyek a definiált 1%-os függvényillesztési hiba kritérium esetén, molekulák méretétől és a referencia mérési módszertől függően 1-10%-os eltéréssel megegyeztek az irodalmi értékekkel.

[T2] Integrált elektródákat és vertikális csapdaszerkezetet tartalmazó PDMS alapú mikrofluidikai rendszert hoztam létre, mely képes sejtcsoportok, vagy egyedi sejtek csapdázására, illetve a sejtek számának párhuzamos optikai és elektromos nyomon követésére.
[P2] [P3] [C4]

(i) Megmutattam, hogy a mikrofluidika rendszer egyedi csatornáinak médiummal való feltöltése 1 kHz-es frekvencián végzett folytonos impedancia méréssel követhető.

(ii) A megvalósított mikrofluidikai rendszerben elektrokémiai impedancia spektroszkópiával vizsgáltam a sejtszám spektrumra gyakorolt hatását S.cerevisiae élesztő sejtek esetén. Megállapítottam,hogy a javasolt módosított Randles ekvivalens áramköri modell illesztése során a töltésátadási ellenállás r = 0.92 korrelációs együtthatóval korrelál a sejtszámok változásával, alacsony sejtszámok (< 20) esetén.

[T3] Közvetlenül SU-8-ban kialakított csatornákat és csapdaszerkezeteket, illetve integrált elektródákat tartalmazó mikrofluidikai rendszert hoztam létre, mely képes sejtcsoportok viabilitásának párhuzamos optikai és elektromos nyomon követésére.
[C5] [C9]

(i) Az integrált elektródák anyagának, geometriájának és elhelyezkedésének optimalizálásával javítottam az impedancia mérésen alapuló analitikai rendszer érzékenységét. Megmutattam, hogy a Pt elektródák alkalmazása javítja a rendszer hosszú távú stabilitását, az elektródák felületének növelése és távolságuk csökkentése javítja a töltésátadási ellenállást.

(ii) 10^6 sejt/ml koncentrációjú S.cerevisiae élesztő sejteket tratalmazó oldat esetén elektrokémiai impedancia spektroszkópiával vizsgáltam a sejtéletképesség UV besugárzás hatására történő változását és igazoltam, hogy a rendszer alkalmas a viabilitás elektromos követésére az ekvivalens áramköri illesztés paramétereinek változását felhasználva. Megállapítottam, hogy az élesztősejtek viabilitásának csökkenése a töltésátadási ellenállás jelentős növekedését, illetve a kettősréteg kapacitást jellemző konstans fáziselem csökkenését okozta.

(iii) Humán rákos MES-SA sejtek vizsgálata esetén megállapítottam, hogy a mikrofluidikai eszköz megfelelő geometriai adaptáció után az optikai és az elektromos módszerek kombinációjával alkalmas a sejtek halálának nyomon követésére.

12. Köszönetnyilvánítás

A köszönetek sorában elsőként szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Fürjes Péternek, aki állandó támogatással kísérte végig akadémiai szárnybontogatásomat és bátorításával ösztönözött arra, hogy megragadjam a legértékesebb lehetőségeket. A stresszes időszakokban végtelen pozitivitással oszlatta el folytonos aggályaimat és kételyeimet, míg útmutatása alatt rugalmasságot és türelmet tanulhattam, melyek erényeimmé válnak majd a jövőre nézve.

Ez úton is szeretnék köszönetet mondani a HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Mikrorendszerek Laboratóriumának és a Nanoérzékelők Laboratórium munkatársainak, a rengeteg segítségért, végtelen türelmükért és a labormunkám során nyújtott hasznos tanácsaikért. Kérdéseimre adott válaszaik és több dologban való közbenjárásuk mind elengedhetetlennek bizonyultak a mérések sikerességéhez és a disszertáció elkészüléséhez.

Külön köszönet illeti Bozorádi János Márkot, Braun Ferencet és Nagy Attilát, akik mindig készségesen bocsátották rendelkezésemre szakértelmüket változatos elektronikai kérdésekben, illetve Erős Magdolnát, Pájer Margitot és Sík Zsuzsannát a tisztatérben végzett kiemelkedő munkájukért. Köszönöm Illés Leventének és Kovács Zoltánnak, hogy felbecsülhetetlen elektronmikroszkópos tudásukkal hozzájárultak a különböző struktúrák vizsgálatához. Hálásan köszönöm Sztyéhlikné Bérces Zsófiának a disszertáció elkészítése során nyújtott lelkiismeretes munkáját. Köszönöm Vizvári Zoltánnak a rengeteg segítséget és együttműködést, mellyel az impedancia spektroszkópia mágikus világában utat mutatott nekem. Köszönöm Füredi Andrásnak, hogy bevezetett a biológiai mintákkal való munka rejtelmeibe.

Köszönettel tartozom az Óbudai Egyetem Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskolájának vezetőjének, Dr. Réger Mihálynak, hogy a doktori iskolába fogadott és támogatta kutatásaimat.

Köszönetet szeretnék mondani a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak, amiért lehetővé tették részvételemet az Új Nemzeti Kiválósági Programban (ÚNKP-23-3-II-OE-66) és az Egyetemi Kutatói Ösztöndíj Programban (EKÖP-24-D-11), melyek során számos releváns szakmai tapasztalatot szereztem.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak a megingathatatlan hitet és támogatást, melyet irányomban mutattak. A sikereimet és a kételyeimet egyaránt a legnagyobb szeretettel hallgatták, míg aggodalmaim gyülekező fellegeit derűvel oszlatták el.

13. Saját publikációk

13.1. Doktori értekezés alapjául szolgáló publikációk

[P1] Lilia Bató, Péter Fürjes, "Diffusion coefficient measurement with fluorescent detection in free-diffusion based microfluidics" Microfluidics and Nanofluidics, 28 (8) pp. 56, 2024; doi:10.1007/s10404-024-02752-w

[P2] Lilia Bató, Péter Fürjes, "Vertical Microfluidic Trapping System for Capturing and Simultaneous Electrochemical Detection of Cells" Sensors, 24 (20), pp. 6638, 2024; doi: 10.3390/s24206638

[P3] Lilia Bató, Péter Fürjes, "Microfluidic System with Integrated Electrode Array for High-Throughput Electrochemical Impedance Spectroscopy Analysis of Localised Cells" Proceedings, 97 (1), 187, 2024; doi: 10.3390/proceedings2024097187

[P4] Lilia Bató, János M. Bozorádi, Zoltán Vizvári and Péter Fürjes, "Microfluidic System With Integrated Electrode Array for Impedance Tomography of Cell Cultures" 2025 Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS (DTIP), Split, Croatia, 2025, pp. 1-5; doi: 10.1109/DTIP66728.2025.11099198

[P5] Lilia Bató, Péter Fürjes, János M. Bozorádi, Vladimir Tadic, Péter Odry, Zoltán Vizvári, "Sensitivity Analysis of Localized Electrochemical Impedance Spectroscopy Towards Tomography-on-a-Chip" Sensors, 25 (20), pp.6393, 2025, doi:10.3390/s25206393

13.1.1. Konferencia részvételek

[C1] Lilia Bató and Péter Fürjes, "Individual cell trapping and viability testing in microfluidic device," Matrafüred – International Meeting on Chemical Sensors, June 12-17, 2022, Visegrád, Hungary (poszter)

[C2] Lilia Bató and Péter Fürjes, "A fluorescent detection method to measure the diffusion coefficients of proteins in a free-diffusion based microfluidic system," Lab-on-a-Chip and Microfluidics Europe, June 21-22, 2022, Rotterdam, The Netherlands (poszter)

[C3] Lilia Bató and Péter Fürjes, "An obstacle-free microfluidic system for monitoring protein diffusion," MBFT XXIX. Congress, August 28-31, 2023, Budapest, Hungary (előadás)

[C4] Lilia Bató and Péter Fürjes, "Microfluidic system with integrated electrode array for EIS analysis of localised cells," Eurosensors 2023 Conference, September 10 - 13, 2023, Lecce, Italy (poszter)

[C5] Lilia Bató, János M. Bozorádi, Zoltán Vizvári, Péter Fürjes "Microfluidic device for impedance tomography" Mátrafüred - International Conference on Chemical Sensors, June 16-21, 2024, Visegrád, Hungary (poszter)

[C6] Lilia Bató, János M. Bozorádi, Zoltán Vizvári, Péter Fürjes, "Microfluidic device for EIS and optical monitoring of cells" EUROoCS Annual Meeting, July 3-5, 2024, Milan, Italy (poszter)

[C7] Lilia Bató, János M. Bozorádi, Zoltán Vizvári, Péter Fürjes, "Microfluidic device with integrated microelectrodes for enhanced EIS sensitivity ," Eurosensors 2024 Conference, September 1 - 4, 2024, Debrecen, Hungary (előadás)

[C8] Lilia Bató, János M. Bozorádi, Zoltán Vizvári, Péter Fürjes, "Microfluidic System With Integrated Electrode Array for Impedance Tomography of Cell Cultures," DTIP 2025 Conference, June 1 - 4, 2025, Split, Croatia (előadás)

[C9] Lilia Bató, János M. Bozorádi, Zoltán Vizvári, Péter Fürjes, "Real-Time Cell Viability Testing in Microfluidic System by EIS," MPS 2025 World Summit, June 10 - 13, 2025, Brussels, Belgium (poszter)

13.2. Egyéb publikációk

[P6] Bányai Anita, Bató Lilia, Leelőssyné Tóth Eszter, Varga Máté, Fürjes Péter, "Áramlástani jelenségek mikroszkopikus mérettartományban – mikrofluidikai rendszerek és alkalmazásaik" Fizikai Szemle (0015-3257): 73 (11) pp. 383–389, 2023

[P7] Barbara Beiler, Ágnes Sáfrány, Lilia Bató, Zsombor Szomor, Miklós Veres "Effect of binary porogen mixtures on polymer monoliths prepared by gamma-radiation initiated polymerization" Heliyon, 10 (19), 2024; doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e38852

[P8] Zsombor Szomor, Lilia Bató, Silvia Stagl, Orsolya Hakkel, Attila Sulyok, Csaba Dücső, Zsófia Baji and Péter Fürjes, "Non-stoichiometric titanium-oxide gate electrodes for EGFET based pH sensors" Proceedings, 97 (1), 187, 2024
doi: 10.3390/proceedings2024097187

[P9] Zsombor Szomor, Lilia Bató, Orsolya Hakkel, Csaba Dücső, Zsófia Baji, Attila Sulyok, Erzsébet Dodony, Katalin Balázsi, János M. Bozorádi, Zoltán Szabó and Péter Fürjes, "Characterisation of Titanium-Oxide Thin Films for Efficient pH Sensing in Low-Power Electrochemical Systems" Sensors, 25 (19), 6113, 2025
doi: 10.3390/s25196113

14. Hivatkozások

[1] A. Francesko, V. F. Cardoso, and S. Lanceros-Méndez, „Lab-on-a-chip technology and microfluidics," in *Microfluidics for Pharmaceutical Applications*, pp. 3–36, Elsevier, 2019.

[2] B. Gupte, U. Jadhav, S. Gosavi, and S. Jagtap, „Lab on chip for medical and clinical applications," *Sensors &; Diagnostics*, vol. 4, no. 11, pp. 939–965, 2025.

[3] J. P. Lafleur, A. Jönsson, S. Senkbeil, and J. P. Kutter, „Recent advances in lab-on-a-chip for biosensing applications," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 76, pp. 213–233, 2016.

[4] C. Zhang, Z. Zhao, N. A. A. Rahim, D. van Noort, and H. Yu, „Towards a human-on-chip: Culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 22, 2009.

[5] D. Wood, D. M. Weingeist, S. Bhatia, and B. Engelward, „Single cell trapping and DNA damage analysis using microwell arrays," *National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 22, pp. 10008–10013, 2010.

[6] D. Caballero, S. Kaushik, V. M. Correli, J. M. Oliveira, R. Reis, and S. C. Kunku, „Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: from chip to the patient," *Biomaterials*, vol. 149, pp. 98–115, 2017.

[7] E. Biselli, E. Agliari, A. Barra, F. R. Bertani, A. Gerardina, A. De Ninno, A. Mencattini, D. Di Giuseppe, M. Fabrizio, G. Schiavoni, V. Lucarini, E. Vacchelli, G. Kroemer, C. Di Natale, E. Martinelli, and L. Buscinaro, „Organs on chip approach: a tool to evaluate cancer -immune cells interactions," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, 2017.

[8] K.-A. Hyun, T. Y. Lee, and H.-I. Jung, „Negative enrichment of circulating tumor cells using a geometrically activated surface interaction chip," *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 9, pp. 4439–4445, 2013.

[9] J. W. Suk and J.-H. Cho, „Capillary flow control using hydrophobic patterns," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, no. 4, pp. N11–N15, 2007.

[10] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, „Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 23, pp. 4974–4984, 1998.

[11] W. Zeng and H. Fu, „Precise measurement and control of the pressure-driven flows for microfluidic systems," *Electrophoresis*, vol. 00, pp. 1–8, 2019.

[12] N. Azizipour, R. Avazpour, D. H. Rosenzweig, M. Sawan, and A. Ajji, „Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip," *Micromachines*, vol. 11, no. 6, p. 599, 2020.

[13] L. A. Low, C. Mummery, B. R. Berridge, C. P. Austin, and D. A. Tagle, „Organs-on-chips: into the next decade," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 20, no. 5, pp. 345–361, 2020.

[14] E. W. Esch, A. Bahinski, and D. Huh, „Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 14, no. 4, pp. 248–260, 2015.

[15] A. Mansoorifar, A. Koklu, and A. Beskok, „Quantification of cell death using an impedance-based microfluidic device," *Analytical Chemistry*, vol. 91, no. 6, pp. 4140–4148, 2019.

[16] D. E. Ingber, „Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine," *Nature Reviews Genetics*, vol. 23, no. 8, pp. 467–491, 2022.

[17] Z. Li, J. Hui, P. Yang, and H. Mao, „Microfluidic organ-on-a-chip system for disease modeling and drug development," *Biosensors*, vol. 12, no. 6, p. 370, 2022.

[18] A. Roth, „Human microphysiological systems for drug development," *Science*, vol. 373, no. 6561, pp. 1304–1306, 2021.

[19] S. Terry, J. Jerman, and J. Angell, „A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979.

[20] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, „Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing," *Sensors and Actuators B*, vol. 1, no. 1-6, pp. 244–248, 1990.

[21] D. J. Harrison, P. G. Glavina, and A. Manz, „Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing," *Sensors and Actuators B*, vol. 10, no. 2, pp. 107–116, 1993.

[22] Y. Xia and G. M. Whitesides, „Soft lithography," *Angew Chem Int Ed Engl.*, vol. 37, no. 5, pp. 550–575, 1998.

[23] C. M. Ardila, „Advancing healthcare through laboratory on a chip technology: Transforming microorganism identification and diagnostics," *World Journal of Clinical Cases*, vol. 13, no. 3, 2025.

[24] Q. Wu, J. Liu, X. Wang, L. Feng, J. Wu, X. Zhu, W. Wen, and X. Gong, „Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects," *BioMedical Engineering OnLine*, vol. 19, no. 1, 2020.

[25] D. Huh, H. Fujioka, Y.-C. Tung, N. Futai, R. Paine, J. B. Grotberg, and S. Takayama, „Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 48, pp. 18886–18891, 2007.

[26] F. Alghannam, M. Alayed, S. Alfihed, M. A. Sakr, D. Almutairi, N. Alshamrani, and N. Al Fayez, „Recent progress in pdms-based microfluidics toward integrated organ-on-a-chip biosensors and personalized medicine," *Biosensors*, vol. 15, no. 2, p. 76, 2025.

[27] D. Kumar, R. Nadda, and R. Repaka, „Advances and challenges in organ-on-chip technology: toward mimicking human physiology and disease in vitro," *Medical &; Biological Engineering & Computing*, vol. 62, no. 7, pp. 1925–1957, 2024.

[28] G. Park, Y. A. Rim, Y. Sohn, Y. Nam, and J. H. Ju, „Replacing animal testing with stem cell-organoids: Advantages and limitations," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 20, no. 6, pp. 1375–1386, 2024.

[29] B. M. Gunasekaran, S. Srinivasan, M. Ezhilan, V. Rajagopal, and N. Nesakumar, „Advancements in organ-on-a-chip systems: Materials, characterization, and applications," *ChemistrySelect*, vol. 9, no. 40, 2024.

[30] S. Yuan, H. Yuan, D. C. Hay, H. Hu, and C. Wang, „Revolutionizing drug discovery: The

impact of distinct designs and biosensor integration in microfluidics-based organ-on-a-chip technology," *Biosensors*, vol. 14, no. 9, p. 425, 2024.

[31] A. Gangwal and A. Lavecchia, „Artificial intelligence in preclinical research: enhancing digital twins and organ-on-chip to reduce animal testing," *Drug Discovery Today*, vol. 30, no. 5, p. 104360, 2025.

[32] C. Jensen and Y. Teng, „Is it time to start transitioning from 2d to 3d cell culture?," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7, 2020.

[33] M. Kapałczyńska, T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, and K. Lamperska, „2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures," *Archives of Medical Science*, vol. 14, no. 4, pp. 910–919, 2016.

[34] N. Miložič, M. Lubej, U. Novak, P. Žnidaršič Plazl, and I. Plazl, „Evaluation of diffusion coefficient determination using a microfluidic device," *Chemical and Biochemical Engineering*, vol. 28, no. 2, pp. 215–223, 2014.

[35] S.-Y. Cheng, S. Heilman, M. Wasserman, S. Archer, M. L. Shuler, and M. Wu, „A hydrogel-based microfluidic device for the studies of directed cell migration," *Lab on a Chip*, vol. 7, no. 6, pp. 763–769, 2007.

[36] X. Wang, Z. Liu, and Y. Pang, „Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems," *RSC Advances*, vol. 7, no. 48, pp. 29966—-29984, 2017.

[37] L.-F. Cai, Y. Zhu, G.-S. Du, and Q. Fang, „Droplet-based microfluidic flow injection system with large-scale concentration gradient by a single nanoliter-scale injection for enzyme inhibition assay," *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 1, pp. 446–452, 2011.

[38] P. S. Dittrich and A. Manz, „Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 3, pp. 210–218, 2006.

[39] L. Hajba and A. Guttman, „Continuous-flow-based microfluidic systems for therapeutic monoclonal antibody production and organ-on-a-chip drug testing," *Journal of Flow Chemistry*, vol. 7, no. 3–4, pp. 118–123, 2017.

[40] A. E. Kamholz and P. Yager, „Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels," *Biophys. J.*, vol. 80, no. 1, pp. 155–160, 2001.

[41] M. Yu, C. T. Silva, A. van Opstal, S. Romejin, H. A. Every, W. Jiskoot, G.-J. Witkamp, and M. Ottens, „The investigation of protein diffusion via H-cell microfluidics," *Byophysical Journal*, vol. 116, pp. 595–609, 2019.

[42] P. Arosio, T. Müller, L. Rajah, E. V. Yates, F. A. Aprile, Y. Zhang, S. I. A. Cohen, D. A. White, T. W. Herling, E. J. D. Genst, S. Linse, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, and T. P. J. Knowles, „Microfluidic diffusion analysis of the sizes and interactions of proteins under native solution conditions," *ACS Nano*, vol. 10, no. 1, pp. 333–341, 2015.

[43] N. Garcia-Seyda, L. Aoun, V. Tishkova, V. Seveau, M. Biarnes-Pelicot, M. Bajénoff, M.-P. Valignat, and O. Theodoly, „Microfluidic device to study flow-free chemotaxis of swimming cells," *Lab on a Chip*, vol. 20, no. 9, pp. 1639–1647, 2020.

[44] F. J. Armistead, J. G. D. Pablo, H. Gadêlha, S. A. Peyman, and S. D. Evans, „Cells under

stress: an inertial-shear microfluidic determination of cell behavior," *Biophys. J.*, vol. 116, no. 6, pp. 1127–1135, 2019.

[45] H. W. Hou, W. C. Lee, M. C. Leong, S. Sonam, S. R. K. Vedula, and C. T. Lim, „Microfluidics for applications in cell mechanics and mechanobiology," *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 4, no. 4, pp. 591–602, 2011.

[46] T. B. Tran, S. Cho, and J. Min, „Hydrogel-based diffusion chip with electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) integration for cell viability assay and drug toxicity screening," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 50, pp. 453–459, 2013.

[47] C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, and J. M. Ramsey, „Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices," *Talanta*, vol. 56, no. 2, pp. 365–373, 2002.

[48] P. K. Challa, Q. Peter, M. A. Wright, Y. Zhang, K. L. Saar, J. A. Carozza, J. L. P. Benesch, and T. P. J. Knowles, „Real-time intrinsic fluorescence visualization and sizing of proteins and protein complexes in microfluidic devices," *Analytical Chemistry*, vol. 90, no. 6, pp. 3849–3855, 2018.

[49] M. M. Schneider, T. P. J. Knowles, S. Keller, and G. Krainer, „Microfluidics for protein interaction studies: current methods, challenges, and future perspectives," *European Biophysics Journal*, 2025.

[50] M. R. G. Kopp and P. Arosio, „Microfluidic approaches for the characterization of therapeutic proteins," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 107, no. 5, pp. 1228–1236, 2018.

[51] A. M. Römgens, D. L. Bader, J. A. Bouwstra, F. P. T. Baaijens, and C. W. J. Oomens, „Diffusion profile of macromolecules within and between human skin layers for (trans)dermal drug delivery," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 50, pp. 215–222, 2015.

[52] D. J. Wolak and R. G. Thorne, „Diffusion of macromolecules in the brain: implications for drug delivery," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 10, no. 5, pp. 1492–1504, 2013.

[53] R. Langer, „New methods of drug delivery.," *Science*, vol. 249, no. 4976, pp. 1527–1533, 1990.

[54] H. Fischer, I. Polikarpov, and A. F. Craievich, „Average protein density is a molecular-weight-dependent function," *Protein Science*, vol. 13, no. 10, pp. 2825–2828, 2009.

[55] E. P. Randviir and C. E. Banks, „Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications," *Analytical Methods*, vol. 5, no. 5, p. 1098, 2013.

[56] E. P. Randviir and C. E. Banks, „A review of electrochemical impedance spectroscopy for bioanalytical sensors," *Analytical Methods*, vol. 14, no. 45, pp. 4602–4624, 2022.

[57] E.-M. Korek, R. Teotia, D. Herbig, and R. Brederlow, „Electrochemical impedance spectroscopy for ion sensors with interdigitated electrodes: Capacitance calculations, equivalent circuit models and design optimizations," *Biosensors*, vol. 14, no. 5, p. 241, 2024.

[58] A. C. Lazanas and M. I. Prodromidis, „Electrochemical impedance spectroscopy – a tutorial," *ACS Measurement Science Au*, vol. 3, no. 3, pp. 162–193, 2023.

[59] T. Gerasimenko, S. Nikulin, G. Zakharova, A. Poloznikov, V. Petrov, A. Baranova, and A. Tonevitsky, „Impedance spectroscopy as a tool for monitoring performance in 3D models of epithelial tissues," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, 2020.

[60] A. Misra, „Concept of the electrochemical double layer," in *Supercapacitors*, 2053-2563, pp. 1–1 to 1–19, IOP Publishing, 2025.

[61] A. Lazanas and B. Prieto Simón, „A guide to recognizing your electrochemical impedance spectra: Revisions of the randles circuit in (bio)sensing," *Sensors*, vol. 25, no. 19, p. 6260, 2025.

[62] E. Barsoukov, *Impedance spectroscopy : theory, experiment, and applications*. Hoboken, NJ: Wiley, 2005.

[63] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan, and A. Mulchandani, „Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications," *Sensors*, vol. 21, no. 19, p. 6578, 2021.

[64] T. K. Bera, „Bioelectrical impedance methods for noninvasive health monitoring: A review," *Journal of Medical Engineering*, vol. 2014, pp. 1–28, 2014.

[65] M. Grossi and B. Riccò, „Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review," *Journal of Sensors and Sensor Systems*, vol. 6, no. 2, pp. 303–325, 2017.

[66] M. Amini, J. Hisdal, and H. Kalvøy, „Applications of bioimpedance measurement techniques in tissue engineering," *Journal of Electrical Bioimpedance*, vol. 9, no. 1, pp. 142–158, 2018.

[67] T. Sun, N. G. Green, and H. Morgan, „Analytical and numerical modeling methods for impedance analysis of single cells on-chip," *Nano*, vol. 03, no. 01, pp. 55–63, 2008.

[68] K. Asami, „Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 305, no. 1-3, pp. 268–277, 2002.

[69] R. Van den Eeckhoudt, A.-S. Christiaens, F. Ceyssens, V. Vangalis, K. J. Verstrepen, N. Boon, F. Tavernier, M. Kraft, and I. Taurino, „Full-electric microfluidic platform to capture, analyze and selectively release single cells," *Lab on a Chip*, vol. 23, no. 19, pp. 4276–4286, 2023.

[70] Y. Geng, Z. Zhu, Z. Zhang, F. Xu, M. A. Marchisio, Z. Wang, D. Pan, X. Zhao, and Q.-A. Huang, „Design and 3D modeling investigation of a microfluidic electrode array for electrical impedance measurement of single yeast cells," *Electrophoresis*, vol. 42, no. 20, pp. 1996–2009, 2021.

[71] L. Wang, S. Hu, K. Liu, B. Chen, H. Wu, J. Jia, and J. Yao, „A hybrid genetic algorithm and Levenberg–Marquardt (GA–LM) method for cell suspension measurement with electrical impedance spectroscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 91, no. 12, p. 124104, 2020.

[72] J. E. B. Randles, „Kinetics of rapid electrode reactions," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 1, pp. 11–19, 1947.

[73] K. S. Cole and R. H. Cole, „Dispersion and absorption in dielectrics i. alternating current characteristics," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 9, no. 4, pp. 341–351, 1941.

[74] Y. Shen, Z. Wang, T. Ren, J. Wen, J. Li, and T. Tang, „Recent advances in microfluidic impedance detection: Principle, design and applications," *Micromachines*, vol. 16, no. 6, p. 683, 2025.

[75] C. E. Rapier, S. Jagadeesan, G. D. Vatine, and H. Ben-Yoav, „Impedance characteristics of microfluidic channels and integrated coplanar parallel electrodes as design parameters for

whole-channel analysis in organ-on-chip micro-systems," *Biosensors*, vol. 14, no. 8, p. 374, 2024.

[76] S. Akhtarian, S. Kaur Brar, and P. Rezai, „Electrochemical impedance spectroscopy-based microfluidic biosensor using cell-imprinted polymers for bacteria detection," *Biosensors*, vol. 14, no. 9, p. 445, 2024.

[77] D. Naranjo-Hernández, J. Reina-Tosina, and M. Min, „Fundamentals, recent advances, and future challenges in bioimpedance devices for healthcare applications," *Journal of Sensors*, vol. 2019, pp. 1–42, 2019.

[78] A. C. Sabuncu, J. Zhuang, J. F. Kolb, and A. Beskok, „Microfluidic impedance spectroscopy as a tool for quantitative biology and biotechnology," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 3, p. 034103, 2012.

[79] X. Liu, Y. Cui, T. Zhao, D. Kawashima, H. Obara, and M. Takei, „Quantitative detection of living yeast fraction from mixed living and dead cell solution by micro electrical impedance spectroscopy," *IEEE Access*, vol. 7, pp. 33970–33977, 2019.

[80] A. Mansoorifar, A. Koklu, A. C. Sabuncu, and A. Beskok, „Dielectrophoresis assisted loading and unloading of microwells for impedance spectroscopy," *ELECTROPHORESIS*, vol. 38, no. 11, pp. 1466–1474, 2017.

[81] J. Yao, T. Kodera, A. Sapkota, H. Obara, and M. Takei, *Experimental study on dielectric properties of yeast cells in micro channel by impedance spectroscopy*. IEEE, 2014.

[82] J. Zhong, D. Yang, Y. Zhou, M. Liang, and Y. Ai, „Multi-frequency single cell electrical impedance measurement for label-free cell viability analysis," *The Analyst*, vol. 146, no. 6, pp. 1848–1858, 2021.

[83] H. P. Schwan, „Electrical properties of tissue and cell suspensions," in *Advances in Biological and Medical Physics*, vol. 5, pp. 147–209, Elsevier, 1957.

[84] J. B. Hasted, *Aqueous Dielectrics*. United Kingdom: Chapman and Hall, 1973.

[85] P. Tawade and M. Mastrangeli, „Integrated electrochemical and optical biosensing in organs-on-chip," *ChemBioChem*, vol. 25, no. 3, 2023.

[86] M. Tian, Y. Ma, and W. Lin, „Fluorescent probes for the visualization of cell viability," *Accounts of Chemical Research*, vol. 52, no. 8, pp. 2147–2157, 2019.

[87] H. Schneckenburger, P. Weber, M. Wagner, S. Schickinger, V. Richter, T. Bruns, W. S. L. Strauss, and R. Wittig, „Light exposure and cell viability in fluorescence microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 245, no. 3, pp. 311–318, 2011.

[88] H.-S. Liu, M.-S. Jan, C.-K. Chou, P.-H. Chen, and N.-J. Ke, „Is green fluorescent protein toxic to the living cells?," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 260, no. 3, pp. 712–717, 1999.

[89] Z. Zhang, X. Huang, K. Liu, T. Lan, Z. Wang, and Z. Zhu, „Recent advances in electrical impedance sensing technology for single-cell analysis," *Biosensors*, vol. 11, no. 11, p. 470, 2021.

[90] Y.-S. Chen, C.-H. Huang, P.-C. Pai, J. Seo, and K. F. Lei, „A review on microfluidics-based impedance biosensors," *Biosensors*, vol. 13, no. 1, p. 83, 2023.

[91] C. E. Rapier, S. Jagadeesan, G. Vatine, and H. Ben-Yoav, „Microfluidic channel sensory system for electro-addressing cell location, determining confluency, and quantifying a general number of cells," *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, 2022.

[92] A. Mansoorifar, A. Koklu, S. Ma, G. V. Raj, and A. Beskok, „Electrical impedance measurements of biological cells in response to external stimuli," *Analytical Chemistry*, vol. 90, no. 7, pp. 4320–4327, 2018.

[93] R. Kargupta, S. Puttaswamy, A. J. Lee, T. E. Butler, Z. Li, S. Chakraborty, and S. Sengupta, „Rapid culture-based detection of living mycobacteria using microchannel electrical impedance spectroscopy (m-EIS)," *Biological Research*, vol. 50, no. 1, 2017.

[94] G. Pitruzzello, S. Johnson, and T. F. Krauss, „Exploring the fundamental limit of antimicrobial susceptibility by near-single-cell electrical impedance spectroscopy," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 224, p. 115056, 2023.

[95] S. Zhu, X. Zhang, Z. Zhou, Y. Han, N. Xiang, and Z. Ni, „Microfluidic impedance cytometry for single-cell sensing: Review on electrode configurations," *Talanta*, vol. 233, p. 122571, 2021.

[96] K. Mahesh, M. Varma, and P. Sen, „Double-peak signal features in microfluidic impedance flow cytometry enable sensitive measurement of cell membrane capacitance," *Lab on a Chip*, vol. 20, no. 22, pp. 4296–4309, 2020.

[97] C. Honrado, P. Bisegna, N. S. Swami, and F. Caselli, „Single-cell microfluidic impedance cytometry: from raw signals to cell phenotypes using data analytics," *Lab on a Chip*, vol. 21, no. 1, pp. 22–54, 2021.

[98] S.-L. Tsai and M.-H. Wang, „24 h observation of a single hela cell by impedance measurement and numerical modeling," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 229, pp. 225–231, 2016.

[99] S. M. Weiz, P. Jha, K. Lee, R. Herzer, O. G. Schmidt, and M. Medina-Sánchez, „Single-cell impedance tomography using rolled-up microtubular sensors," *Advanced Materials Technologies*, vol. 8, no. 23, 2023.

[100] H. Gershon and D. Gershon, „The budding yeast, saccharomyces cerevisiae, as a model for aging research: a critical review," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 120, no. 1–3, pp. 1–22, 2000.

[101] Y. Zhu, K. Mandal, A. L. Hernandez, S. Kawakita, W. Huang, P. Bandaru, S. Ahadian, H.-J. Kim, V. Jucaud, M. R. Dokmeci, and A. Khademhosseini, „State of the art in integrated biosensors for organ-on-a-chip applications," *Current Opinion in Biomedical Engineering*, vol. 19, p. 100309, 2021.

[102] S. E. D. León, A. Pupovac, and S. L. McArthur, „Three-dimensional (3D) cell culture monitoring: opportunities and challenges for impedance spectroscopy," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, no. 4, pp. 1230–1240, 2020.

[103] H. T. Ngoc Le, J. Kim, J. Park, and S. Cho, „A review of electrical impedance characterization of cells for label-free and real-time assays," *BioChip Journal*, vol. 13, no. 4, pp. 295–305, 2019.

[104] Y. Wang, H. Wu, Y. Geng, Z. Zhang, J. Fu, J. Ouyang, and Z. Zhu, „Equivalent circuit mo-

deling and analysis for microfluidic electrical impedance monitoring of single-cell growth," *Biosensors*, vol. 15, no. 2, p. 113, 2025.

[105] H. M. Davey and P. Hexley, „Red but not dead? membranes of stressed Saccharomyces cerevisiaeare permeable to propidium iodide," *Environmental Microbiology*, vol. 13, no. 1, pp. 163–171, 2010.

[106] C.-H. Chuang, C.-H. Wei, Y.-M. Hsu, H.-C. Chen, and C.-H. Wang, *Depth effects of DEP chip with microcavities array on impedance measurement for live and dead cells*. IEEE, 2008.

[107] K. Benson, S. Cramer, and H.-J. Galla, „Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond," *Fluids and Barriers of the CNS*, vol. 10, no. 1, 2013.

[108] P. Yang, F. Zheng, Q. Li, TianTian, G. Zhang, L. Wu, and H. Mao, „An easy-repeat method to build a blood-brain barrier model on a chip with independent TEER detection module," *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 50, no. 2, 2021.

[109] Y. I. Wang, H. E. Abaci, and M. L. Shuler, „Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 114, no. 1, pp. 184–194, 2016.

[110] O. Y. F. Henry, R. Villenave, M. J. Cronce, W. D. Leineweber, M. A. Benz, and D. E. Ingber, „Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function," *Lab on a Chip*, vol. 17, no. 13, pp. 2264–2271, 2017.

[111] B. M. Maoz, A. Herland, O. Y. F. Henry, W. D. Leineweber, M. Yadid, J. Doyle, R. Mannix, V. J. Kujala, E. A. FitzGerald, K. K. Parker, and D. E. Ingber, „Organs-on-chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities," *Lab on a Chip*, vol. 17, no. 13, pp. 2294–2302, 2017.

[112] M. Malik, S. A. Steele, D. Mitra, C. J. Long, and J. J. Hickman, „Trans-epithelial/endothelial electrical resistance (TEER): Current state of integrated TEER measurements in organ-on-a-chip devices," *Current Opinion in Biomedical Engineering*, vol. 34, p. 100588, 2025.

[113] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. Shuler, and J. J. Hickman, „TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems," *Journal of Laboratory Automation*, vol. 20, no. 2, pp. 107–126, 2015.

[114] J. Hong, K. Kandasamy, M. Marimuthu, C. S. Choic, and S. Kim, „Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study," *The Analyst*, vol. 136, no. 2, pp. 237–245, 2010.

[115] J. Wegener, C. R. Keese, and I. Giaever, „Electric cell–substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces," *Experimental Cell Research*, vol. 259, no. 1, pp. 158–166, 2000.

[116] L. Schaller, K. Hofmann, F. Geiger, and A. Dietrich, „Electrical cell-substrate impedance sensing (ECIS) in lung biology and disease," *Applied Research*, vol. 3, no. 6, 2024.

[117] V. D. Ramaswamy and M. Keidar, „Progressive approaches in oncological diagnosis and surveillance: Real-time impedance-based techniques and advanced algorithms," *Bioelectromagnetics*, vol. 46, no. 1, 2025.

[118] D. D. Stupin, E. A. Kuzina, A. A. Abelit, A. K. Emelyanov, D. M. Nikolaev, M. N. Ryazantsev, S. V. Koniakhin, and M. V. Dubina, „Bioimpedance spectroscopy: basics and applications," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 7, pp. 19662–1986, 2021.

[119] S. E. D. León, A. Pupovac, and S. L. McArthur, „Three-dimensional (3D) cell culture monitoring: opportunities and challenges for impedance spectroscopy," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, pp. 1230–1240, 2020.

[120] M. Schwarz, M. Jendrusch, and I. Constantinou, „Spatially resolved electrical impedance methods for cell and particle characterization," *ELECTROPHORESIS*, vol. 41, no. 1–2, pp. 65–80, 2019.

[121] P. Peng, Y. Fu, B. Che, X. Li, L. Liu, J. Sun, T. Luo, and L. Deng, „Development and evaluation of an electrical impedance tomography (eit) sensor for real-time monitoring of hemolysis dynamics," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1350, p. 343812, 2025.

[122] M. Kokabi, G. M. Rather, and M. Javanmard, „Ionic cell microscopy: A new modality for visualizing cells using microfluidic impedance cytometry and generative artificial intelligence," *Biosensors and Bioelectronics: X*, vol. 24, p. 100619, 2025.

[123] N. Ngamdi, J. Sriwilai, T. Trongwongsa, and T. Ouypornkochagorn, „A development of electrode probes for imaging precancerous lesions with electrical impedance tomography technique: A phantom study," *Journal of Applied Science and Engineering*, vol. 27, 2023.

[124] S. Um, J. Lee, and H.-J. Yoo, „A 3.8-mw 1.9-m ω /$\sqrt{\text{Hz}}$ electrical impedance tomography IC with high input impedance and loading effect calibration for 3-D early breast cancer detect system," *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, vol. 59, no. 7, pp. 2019–2028, 2024.

[125] Q. Deng, J. He, C. Zhu, H. Wang, K. Liu, B. Sun, and J. Yao, „Three-dimensional bioelectrical impedance spectroscopic tomography for visualization of breast tumor," *IEEE Sensors Journal*, vol. 23, no. 17, pp. 19598–19605, 2023.

[126] C. Putensen, B. Hentze, S. Muenster, and T. Muders, „Electrical impedance tomography for cardio-pulmonary monitoring," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, no. 8, p. 1176, 2019.

[127] Z. Sari, M. Klincsik, P. Odry, V. Tadic, A. Toth, and Z. Vizvari, „Lumped element method based conductivity reconstruction algorithm for localization using symmetric discrete operators on coarse meshes," *Symmetry*, vol. 15, no. 5, 2023.

[128] Y. Deng, Y. Guo, and B. Xu, „Recent development of microfluidic technology for cell trapping in single cell analysis: A review," *Processes*, vol. 8, no. 10, p. 1253, 2020.

[129] T. Luo, L. Fan, R. Zhu, and D. Sun, „Microfluidic single-cell manipulation and analysis: Methods and applications," *Micromachines*, vol. 10, no. 2, p. 104, 2019.

[130] S. Kumari, U. Saha, M. Bose, D. Murugan, V. Pachauri, V. V. R. Sai, and N. Madaboosi, „Microfluidic platforms for single cell analysis: Applications in cellular manipulation and optical biosensing," *Chemosensors*, vol. 11, no. 2, p. 107, 2023.

[131] H. Yun, K. Kim, and W. G. Lee, „Cell manipulation in microfluidics," *Biofabrication*, vol. 5, no. 2, p. 022001, 2013.

[132] V. Narayanamurthy, S. Nagarajan, A. Y. Firus Khan, F. Samsuri, and T. M. Sridhar, „Microfluidic hydrodynamic trapping for single cell analysis: mechanisms, methods and applications," *Analytical Methods*, vol. 9, no. 25, pp. 3751–3772, 2017.

[133] V. H. Perez-Gonzalez, „Particle trapping in electrically driven insulator-based microfluidics: Dielectrophoresis and induced-charge electrokinetics," *ELECTROPHORESIS*, vol. 42, no. 23, pp. 2445–2464, 2021.

[134] Z. Pilát, A. Jonáš, J. Ježek, and P. Zemánek, „Effects of infrared optical trapping on saccharomyces cerevisiae in a microfluidic system," *Sensors*, vol. 17, no. 11, p. 2640, 2017.

[135] F. Alnaimat, S. Dagher, B. Mathew, A. Hilal-Alnqbi, and S. Khashan, „Microfluidics based magnetophoresis: A review," *The Chemical Record*, vol. 18, no. 11, pp. 1596–1612, 2018.

[136] P. Zhang, H. Bachman, A. Ozcelik, and T. J. Huang, „Acoustic microfluidics," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 17–43, 2020.

[137] H. Jayan, H. Pu, and D.-W. Sun, „Recent developments in raman spectral analysis of microbial single cells: Techniques and applications," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, no. 16, pp. 4294–4308, 2021.

[138] S. Zheng, H. Lin, J.-Q. Liu, M. Balic, R. Datar, R. J. Cote, and Y.-C. Tai, „Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells," *Journal of Chromatography A*, vol. 1162, no. 2, pp. 154–161, 2007.

[139] D. D. Carlo, L. Y. Wu, and L. P. Lee, „Dynamic single cell culture array," *Lab on a Chip*, vol. 6, no. 11, p. 1445, 2006.

[140] J. R. Rettig and A. Folch, „Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 17, pp. 5628–5634, 2005.

[141] T. Arakawa, M. Noguchi, K. Sumitomo, Y. Yamaguchi, and S. Shoji, „High-throughput single-cell manipulation system for a large number of target cells," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 1, 2011.

[142] X.-B. Wang, Y. Huang, J. P. H. Burt, G. H. Markx, and R. Pethig, „Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 26, no. 8, pp. 1278–1285, 1993.

[143] M. Li, W. H. Li, J. Zhang, G. Alici, and W. Wen, „A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 47, no. 6, p. 063001, 2014.

[144] M. Evander, L. Johansson, T. Lilliehorn, J. Piskur, M. Lindvall, S. Johansson, M. Almqvist, T. Laurell, and J. Nilsson, „Noninvasive acoustic cell trapping in a microfluidic perfusion system for online bioassays," *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 7, pp. 2984–2991, 2007.

[145] M. Evander and J. Nilsson, „Acoustofluidics 20: Applications in acoustic trapping," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 22, p. 4667, 2012.

[146] N. Pamme, „Magnetism and microfluidics," *Lab Chip*, vol. 6, no. 1, pp. 24–38, 2006.

[147] W. H. Chong, S. S. Leong, and J. Lim, „Design and operation of magnetophoretic systems at microscale: Device and particle approaches," *ELECTROPHORESIS*, vol. 42, no. 21–22, pp. 2303–2328, 2021.

[148] H. Lee, A. M. Purdon, and R. M. Westervelt, „Manipulation of biological cells using a microelectromagnet matrix," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, no. 6, pp. 1063–1065, 2004.

[149] A. Bunea and J. Glückstad, „Strategies for optical trapping in biological samples: Aiming at microrobotic surgeons," *Laser & Photonics Reviews*, vol. 13, no. 4, 2019.

[150] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, „Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices," *Accounts of Chemical Research*, vol. 35, no. 7, pp. 491–499, 2002.

[151] K. Raj M and S. Chakraborty, „Pdms microfluidics: A mini review," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 137, no. 27, 2020.

[152] M. Yao and J. Fang, „Hydrophilic peo-pdms for microfluidic applications," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 22, no. 2, p. 025012, 2012.

[153] J. Zhou, D. A. Khodakov, A. V. Ellis, and N. H. Voelcker, „Surface modification for pdms-based microfluidic devices," *ELECTROPHORESIS*, vol. 33, no. 1, pp. 89–104, 2011.

[154] P. Abgrall, V. Conedera, H. Camon, A. Gue, and N. Nguyen, „Su-8 as a structural material for labs-on-chips and microelectromechanical systems," *ELECTROPHORESIS*, vol. 28, no. 24, pp. 4539–4551, 2007.

[155] H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud, and P. Vettiger, „Su-8: a low-cost negative resist for mems," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 7, no. 3, pp. 121–124, 1997.

[156] A. Borók, K. Laboda, and A. Bonyár, „PDMS bonding technologies for microfluidic applications: a review," *Biosensors*, vol. 11, no. 8, p. 292, 2021.

[157] P. Fürjes, E. G. Holczer, E. Tóth, K. Iván, Z. Fekete, D. Bernier, F. Dortu, and D. Giannone, „PDMS microfluidics developed for polymer based photonic biosensors," *Microsystem Technologies*, vol. 21, no. 3, pp. 581–590, 2014.

[158] Z. Vizvari, N. Gyorfi, A. Odry, Z. Sari, M. Klincsik, M. Gergics, L. Kovacs, A. Kovacs, J. Pal, Z. Karadi, P. Odry, and A. Toth, „Physical validation of a residual impedance rejection method during ultra-low frequency bio-impedance spectral measurements," *Sensors*, vol. 20, no. 17, p. 4686, 2020.

[159] Z. Vizvari, N. Gyorfi, G. Maczko, R. Varga, R. Jakabfi-Csepregi, Z. Sari, A. Furedi, E. Bajtai, V. Vajda, Flora Tadic, P. Odry, Z. Karadi, and A. Toth, „Reproducibility analysis of bioimpedance-based self-developed live cell assays," *Scientific Reports*, vol. 14, no. 1, 2024.

[160] A. M. Taylor, M. Blurton-Jones, S. W. Rhee, D. H. Cribbs, C. W. Cotman, and N. L. Jeon, „A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport," *Nature Methods*, vol. 2, no. 8, pp. 599–605, 2005.

[161] M. A. Iyer and D. T. Eddington, „Storing and releasing rhodamine as a model hydrophobic compound in polydimethylsiloxane microfluidic devices," *Lab on a Chip*, vol. 19, no. 4, pp. 574–579, 2019.

[162] H. Zhang, Y. Yao, Y. Hui, L. Zhang, N. Zhou, and F. Ju, „A 3D-printed microfluidic gradient concentration chip for rapid antibiotic-susceptibility testing," *Bio-Design and Manufacturing*, vol. 5, no. 1, pp. 210–219, 2021.

[163] B. Stopa, J. Rybarska, A. Drozd, L. Konieczny, M. Król, M. Lisowski, B. Piekarska, I. Roterman, P. Spólnik, and G. Zemanek, „Albumin binds self-assembling dyes as specific polymolecular ligands," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 40, no. 1, pp. 1–8, 2006.

[164] A. Heeren, C. Luo, G. Roth, A. Ganser, R. Brock, K.-H. Wiesmueller, W. Henschel, and

D. Kern, „Diffusion along microfluidic channels," *Microelectronic Engineering*, vol. 83, no. 4–9, pp. 1669–1672, 2006.

[165] C. Wischke and H. H. Borchert, „Fluorescein isothiocyanate labelled bovine serum albumin (FITC-BSA) as a model protein drug: opportunities and drawbacks.," *Die Pharmazie*, vol. 61, pp. 770–774, 2006.

[166] M. T. Tyn and T. W. Gusek, „Prediction of diffusion coefficients of proteins," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 35, no. 4, pp. 327–338, 1990.

[167] S. A. Rani, B. Pitts, and P. S. Stewart, „Rapid diffusion of fluorescent tracers intob Staphylococcus epidermidis biofilms visualized by time lapse microscopy," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 2, pp. 728–732, 2005.

[168] E. Parker and P. Lollar, „Measurement of the translational diffusion coefficient and hydrodynamic radius of proteins by dynamic light scattering," *BIO-PROTOCOL*, vol. 11, no. 20, 2021.

[169] T. Jøssang, J. Feder, and E. Rosenqvist, „Photon correlation spectroscopy of human IgG," *Journal of Protein Chemistry*, vol. 7, no. 2, pp. 165–171, 1988.

[170] P.-O. Gendron, F. Avaltroni, and K. J. Wilkinson, „Diffusion coefficients of several rhodamine derivatives as determined by pulsed field gradient–nuclear magnetic resonance and fluorescence correlation spectroscopy," *Journal of Fluorescence*, vol. 18, no. 6, pp. 1093–1101, 2008.

[171] A. Ojha and N. K. Ojha, „Excitation light-induced phototoxicity during fluorescence imaging," *Journal of Biosciences*, vol. 46, no. 3, 2021.

[172] A. Kiepas, E. Voorand, F. Mubaid, P. M. Siegel, and C. M. Brown, „Optimizing live-cell fluorescence imaging conditions to minimize phototoxicity," *Journal of Cell Science*, vol. 133, no. 4, 2020.

[173] J. Wiedenmann, F. Oswald, and G. U. Nienhaus, „Fluorescent proteins for live cell imaging: Opportunities, limitations, and challenges," *IUBMB Life*, vol. 61, no. 11, pp. 1029–1042, 2009.

[174] K. Torres-Castro, C. Honrado, W. B. Varhue, V. Farmehini, and N. S. Swami, „High-throughput dynamical analysis of dielectrophoretic frequency dispersion of single cells based on deflected flow streamlines," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 412, p. 3847–3857, 2020.

[175] P. R. C. Gascoyne, S. Shim, J. Noshari, F. F. Becker, and K. Stemke-Hale, „Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation," *ELECTROPHORESIS*, vol. 34, no. 7, pp. 1042–1050, 2013.

[176] G. Schade-Kampmann, A. Huwiler, M. Hebeisen, T. Hessler, and M. D. Berardino, „On-chip non-invasive and label-free cell discrimination by impedance spectroscopy," *Cell Proliferation*, vol. 41, no. 5, pp. 830–840, 2008.

[177] A. K. Okyay, O. Hanoglu, M. Yuksel, H. Acar, S. Sülek, B. Tekcan, S. Agan, N. Biyikli, and M. O. Guler, „Using nanogap in label-free impedance based electrical biosensors to overcome electrical double layer effect," *Microsystem Technologies*, vol. 23, no. 4, pp. 889–897, 2015.

[178] X. Chen, Z. Guo, G.-M. Yang, J. Li, M.-Q. Li, J.-H. Liu, and X.-J. Huang, „Electrical nanogap devices for biosensing," *Materials Today*, vol. 13, no. 11, pp. 28–41, 2010.

[179] N. Stankova, P. Atanasov, R. Nikov, R. Nikov, N. Nedyalkov, T. Stoyanchov, N. Fukata, K. Kolev, E. Valova, J. Georgieva, and S. Armyanov, „Optical properties of polydimethylsiloxane (PDMS) during nanosecond laser processing," *Applied Surface Science*, vol. 374, pp. 96–103, 2016.

[180] J. K. Kim, V. G. Petin, and M. D. Tkhabisimova, „Survival and recovery of yeast cells after simultaneous treatment of uv light radiation and heat," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 79, no. 4, pp. 349–355, 2004.

[181] K. Naito, K. Sawadaishi, and M. Kawasaki, „Photobiochemical mechanisms of biomolecules relevant to germicidal ultraviolet irradiation at 222 and 254 nm," *Scientific Reports*, vol. 12, Oct. 2022.

[182] Q. Ong, W. Wee, J. Dela Cruz, J. W. R. Teo, and W. Han, „222-Nanometer far-UVC exposure results in DNA damage and transcriptional changes to mammalian cells," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 16, p. 9112, 2022.

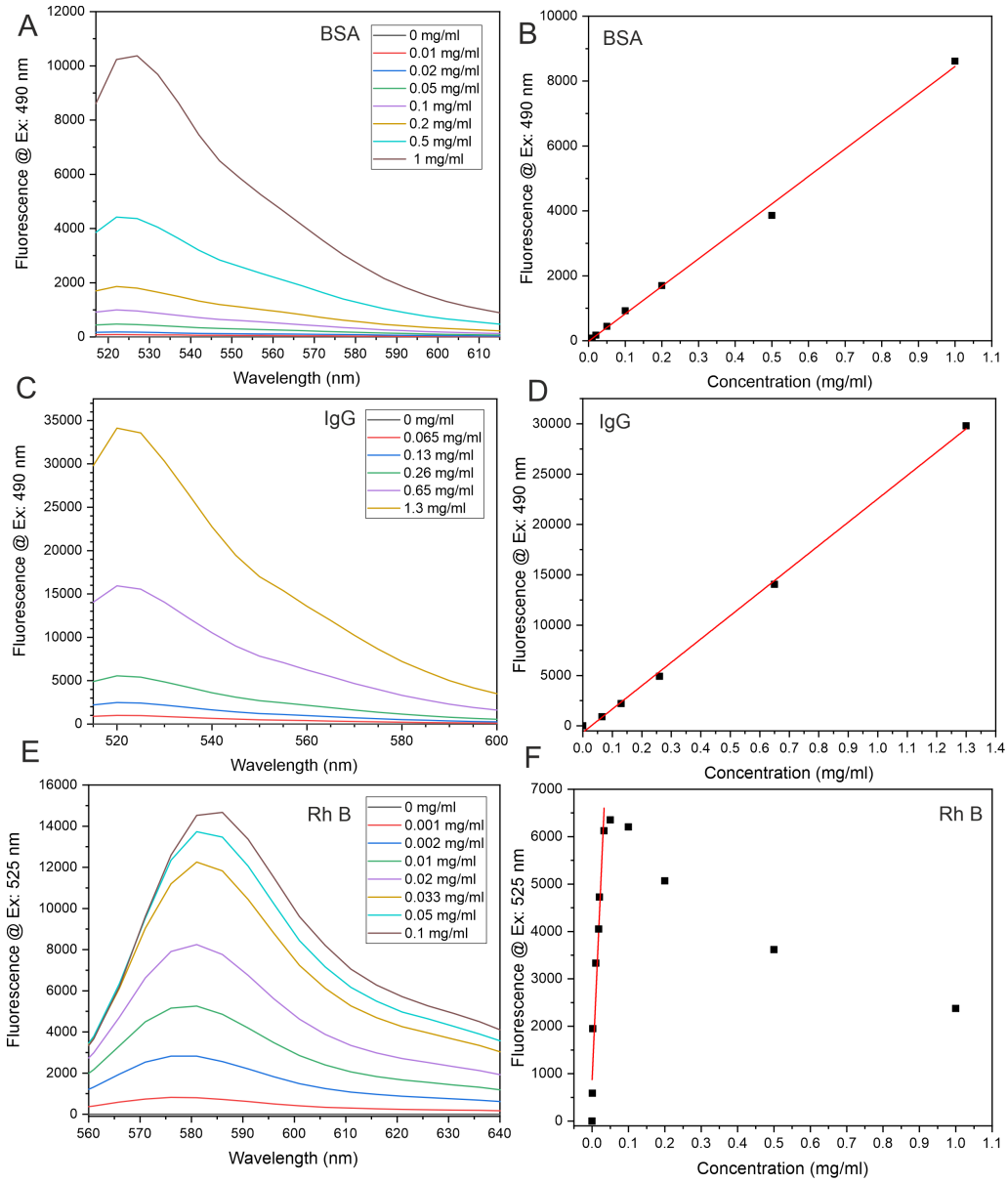
[183] P. Schober, C. Boer, and L. A. Schwarte, „Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation," *Anesthesia &; Analgesia*, vol. 126, no. 5, pp. 1763–1768, 2018.

15. Függelék

15.1. Linearitás vizsgálata

F1. táblázat. A különböző anyagok higítási sorai

	Koncentráció (mg/ml)						
BSA	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01
IgG	1.3	0.65	0.26	0.13	0.065		
Rh B	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.033	0.02
	0.01	0.002	0.001				



F1. ábra. Különböző koncentrációjú oldatok fluoreszcens spektruma (A) BSA, (C) IgG és (E) Rh B oldatok esetén, és a hozzájuk tartozó intenzitások 517 nm-en (B) BSA és (D) IgG esetén, 566 nm-en (F) Rh B (E) esetén.

15.2. Python programkód a diffúziós mérések kiértékeléséhez

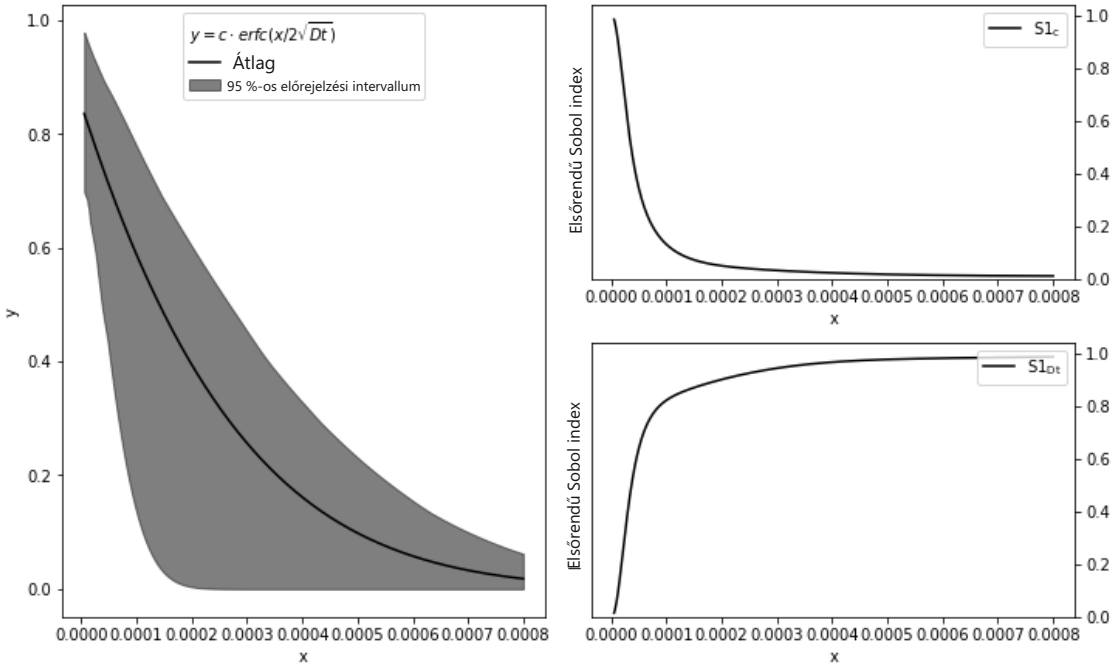
A kiértékeléshez készített Jupyter notebook a következő linken található:
https://github.com/Lilelel/Diffusion-coefficient-fit/tree/main

15.3. Érzékenységvizsgálat a diffúziós profilok illesztési paramétereire

A paraméterek érzékenységi vizsgálatához a Python SALib modulját használtam. A diffúziós profilok illesztése a fenti Python kóddal történt az alábbi egyenlet szerint:

$$c(z,t) = c_0 \cdot erfc\left(\frac{z}{2\sqrt{Dt}}\right) \tag{20}$$

A kezdeti koncentráció (c_0) és a diffúziós állandó (D) illesztési paramétereinek érzékenységét a Python SALib moduljával végeztem. A koncentráció és a relatív intenzitás értékeit 0.7–1 tartományban, míg a diffúziós állandót az elméleti értékekhez képest releváns nagyságrendben változtattam. A F2. ábrán látható az IgG molekula esetén elvégzett érzékenységvizsgálat.



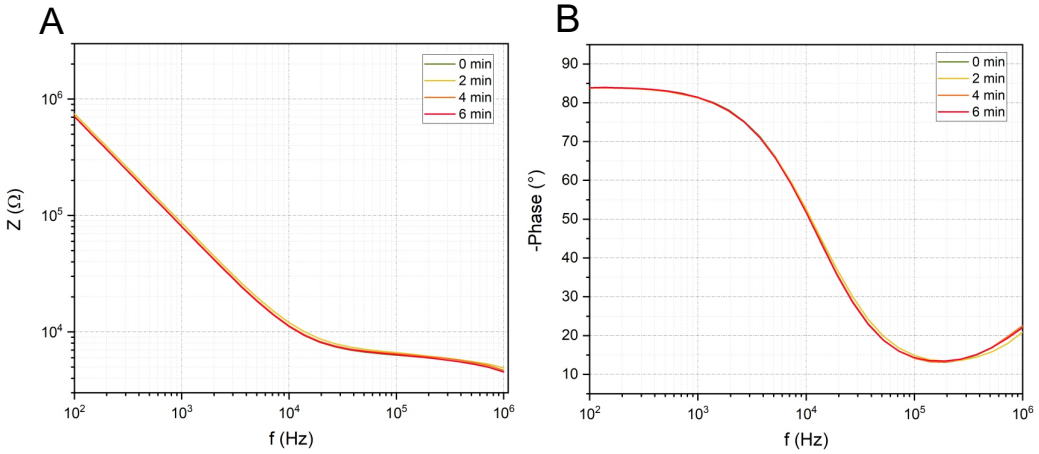
F2. ábra. A kezdeti koncentráció (c_0) csupán a forrásfelülethez közeli (50 µm) tartományon befolyásolja jelentősen az illesztés pontosságát, míg a mikrofluidikai csatorna nagy részében a diffúziós állandó a domináns paraméter

15.4. Ekvivalens áramköri illesztéses - CELLAN

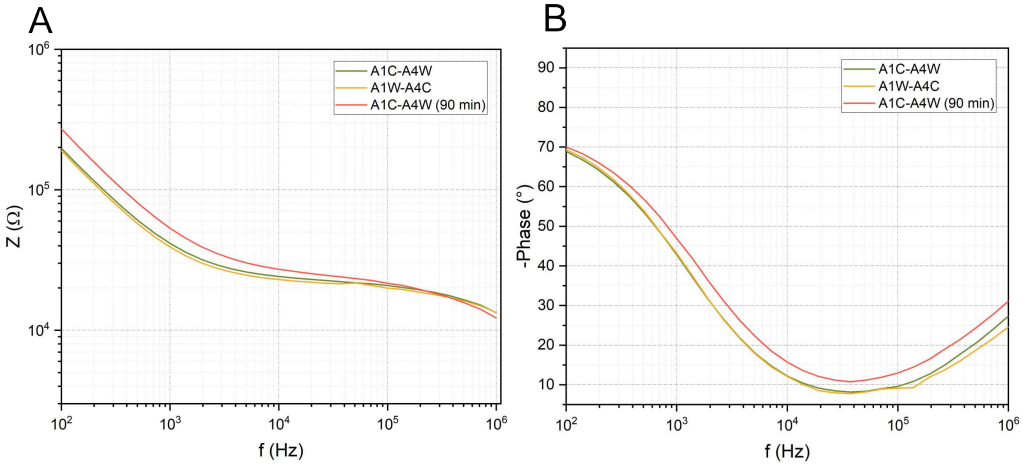
F2. táblázat. A csapdázott sejtek száma, az oldat ellenállása (R_s) a töltésátadási ellenállás (R_{ct}) és az elektromos kettősréteg kapacitás (C_{DL}) illesztett értékei az egyedi (felső rész) és a három párhuzamos (alsó rész) elektróda esetén

Sejtszám [db]	R_s [Ω]	R_{ct} [kΩ]	C_{DL} [nF]
0	588.2 ± 35.84%	1106 ± 6.91%	0.040 ± 1.87%
1	486.4 ± 47.37%	1009 ± 7.70%	0.040 ± 1.81%
2	562.5 ± 31.23%	898.8 ± 4.44%	0.041 ± 1.61%
5	560.3 ± 31.48%	814.8 ± 4.34%	0.041 ± 1.63%
9	567.3 ± 30.06%	758.4 ± 2.72%	0.041 ± 4.38%
8	609.5 ± 34.14%	466.1 ± 3.99%	0.043 ± 2.04%
10	308.7 ± 49.19%	405.4 ± 2.72%	0.042 ± 1.55%
20	324.9 ± 48.69%	349.5 ± 3.44%	0.042 ± 1.60%

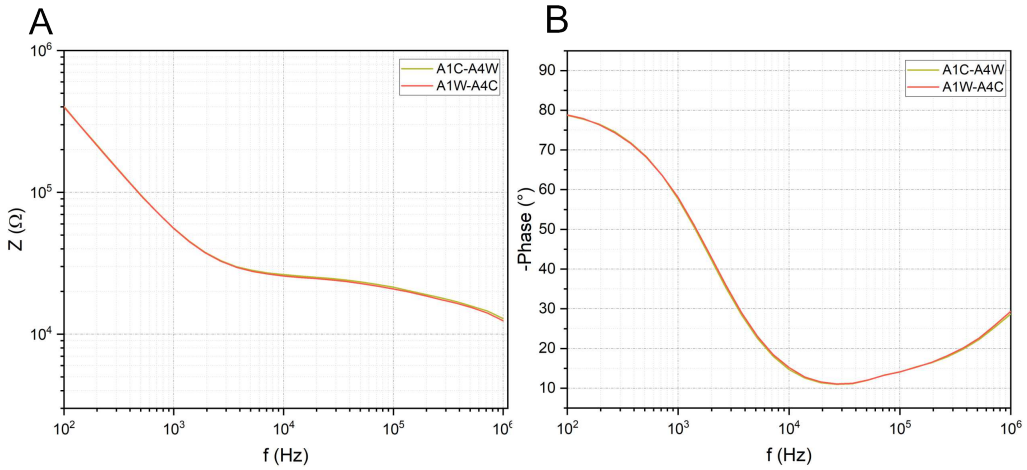
15.5. További mérések - CELLAN 4EL



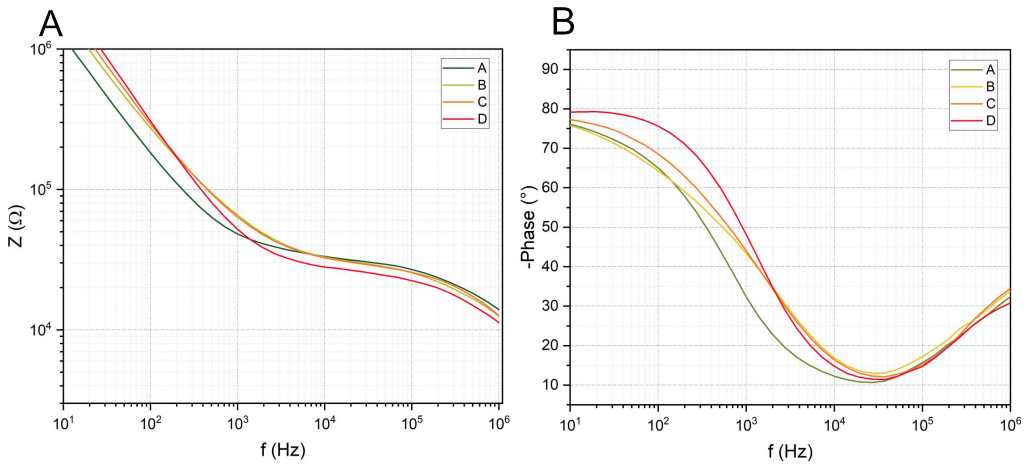
F3. ábra. 4EL3 Pt chip A2-A3 elektródáján fiziológiás sóoldattal végzett ismétlő méréseinek Bode-diagramjai



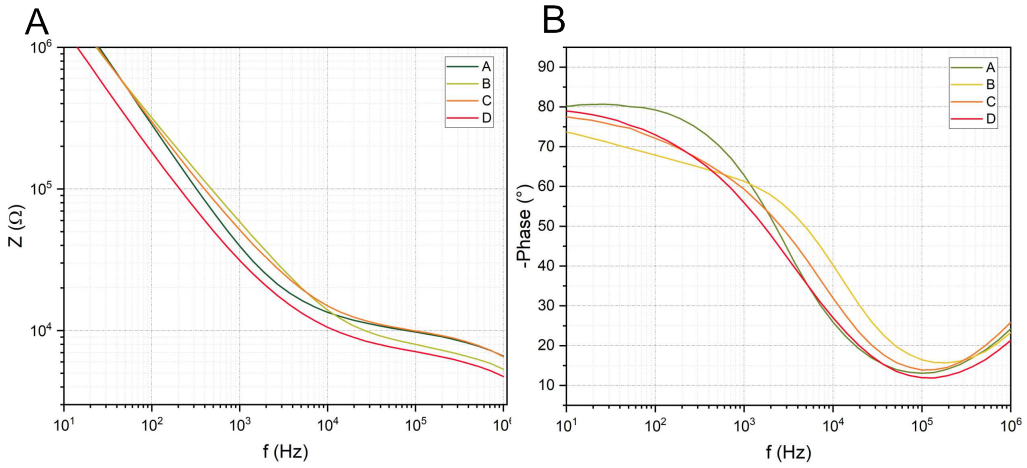
F4. ábra. 4EL1 Au chip A1-A4 elektródáinak fiziológiás sóoldattal végzett méréseinek Bode-diagramjai, a munkaelektród (W) és az ellenelektróda (C) cseréjének hatása az impedanciára, valamint 90 perc elteltével az chip új feltöltése



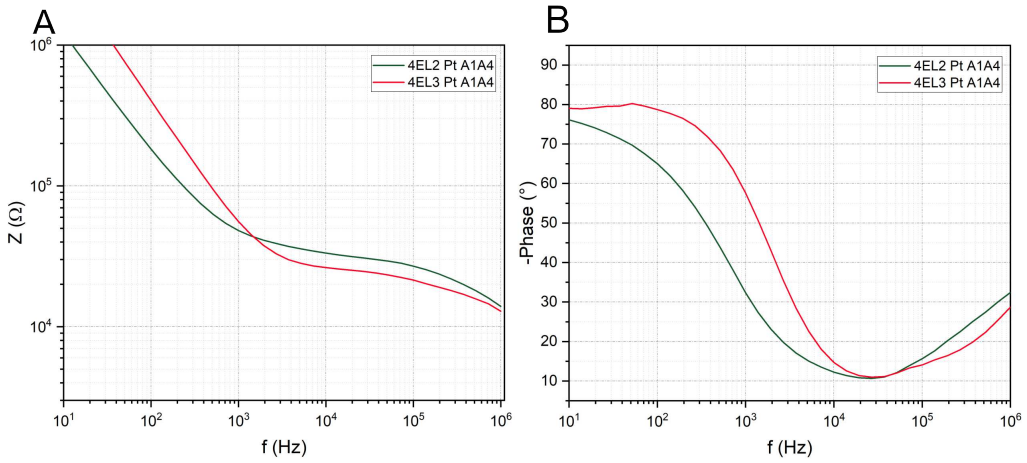
F5. ábra. 4EL3 Pt chip A1-A4 elektródáinak fiziológiás sóoldattal végzett méréseinek Bode-diagramjai, a munkaelektród (W) és az ellenelektróda (C) cseréjének hatása az impedanciára



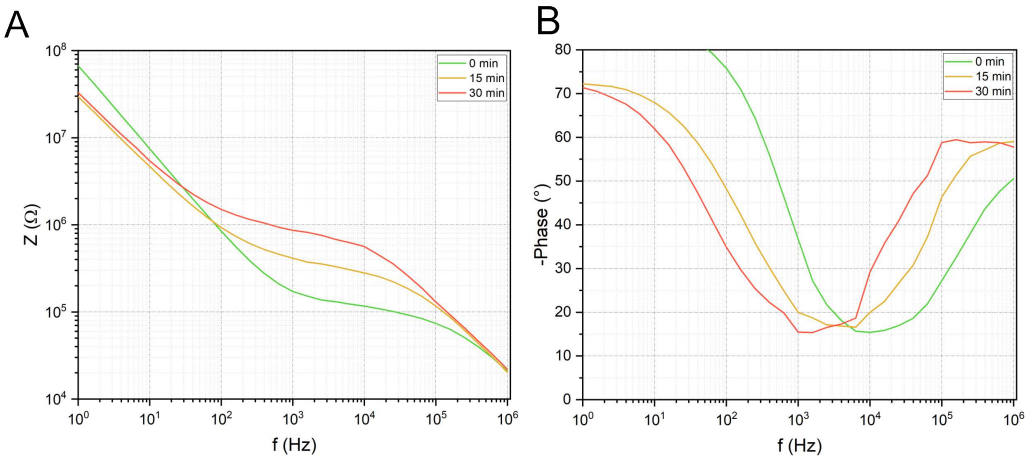
F6. ábra. 4EL2 Pt chip összes, A,B,C,D fluidikai csatornáinak külső elektródpárjain fiziológiás sóoldattal végzett mérések Bode-diagramjai



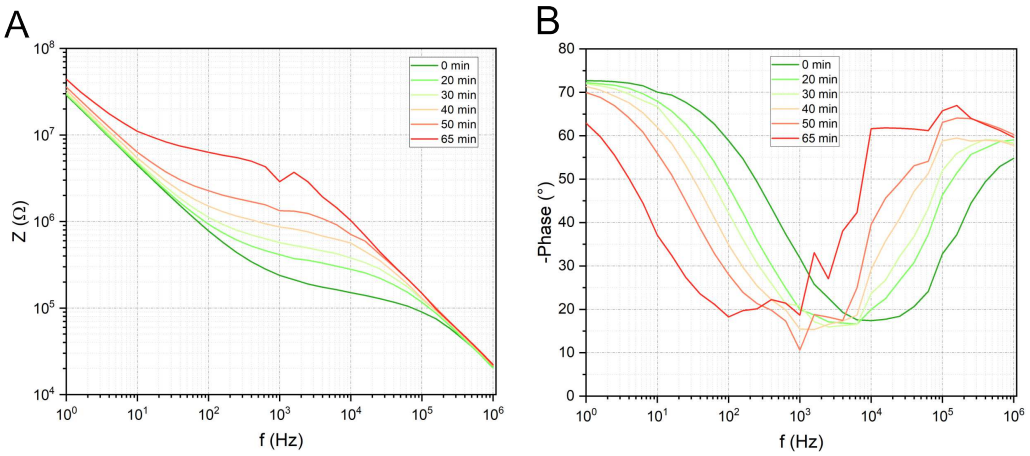
F7. ábra. 4EL2 Pt chip összes, A,B,C,D fluidikai csatornáinak belső elektródpárjain fiziológiás sóoldattal végzett mérések Bode-diagramjai



F8. ábra. 4EL2 és 4EL3 Pt chipek A1-A4 elektródáin fiziológiás sóoldattal végzett mérések Bode-diagramjai



F9. ábra. 4EL3 Au chip B2-B3 elektródáin mért impedancia változása a csapdázott sejtek viabilitásának UV sugárzás hatására bekövetkező csökkenése miatt, Bode-diagramokon ábrázolva.



F10. ábra. 4EL2 Pt chip B2-B3 elektródáin mért impedancia változása a csapdázott sejtek viabilitásának UV sugárzás hatására bekövetkező csökkenése miatt, Bode-diagramokon ábrázolva. Az 57. ábrán bemutatott mérések a 4EL2 Pt chipen történtek.