Biológiai mozgások modellezése fénnyel készített és fénnyel hajtott mikrorobotok segítségével

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Buzás András

Témavezető:

Prof. Ormos Pál

Kutatóprofesszor

Fizikai Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

2019

Szeged

Bevezetés

A mikroszkopikus biológiai rendszerek mozgása nagyon különbözik attól, ahogy a makro világunkban látott testek mozognak. E kérdéskör rendkívül érdekes és fontos mind elméleti, mind pedig gyakorlati szempontból, és számos, szerteágazó, jellegzetes kérdéskört érint. Nagyon fontos gyakorlati cél például a bakteriális fertőzések megelőzése, legyőzése. Ehhez a fertőzés folyamatának pontos jellemzése szükséges. A baktériumok (egyedi, illetve nagyszámú egyed együttes) mozgásának jobb megismerése nyilvánvalóan közelebb visz a problémakör kezeléséhez. A baktériumok mozgása sajátos fizikai problémakör. Ismert, hogy a kis Reynolds-számmal jellemezhető rendszerekben az úszás mechanizmusa nagyon más, mint a makroszkopikus világban, a lehetséges megvalósulások részletes jellemzése még távolról sem teljes. Sok érdekes hatást is megfigyeltek e világban, pl. az egymás közelében mozgó részecskék hidrodinamikai kölcsönhatása, kollektív mozgása, bizonyos mozgások szinkronizációja, stb. – szükség lenne e jelenségek nagy pontosságú jellemzésére, kvantitatív leírására. A jellemzően mikrométeres méretű testek kis Reynolds-számokkal jellemzett mozgásának két markáns jellegzetessége van. Egyrészt, a viszkózus erőkhöz képest a tehetetlenség elhanyagolható. Emellett, a mikronos méretek miatt aránylag nagymértékű a Brown-fluktuáció, a mozgást mindig ez kíséri. Mindezek következtében a mozgás és a meghajtás mechanizmusa teljesen más, mint a makro világban. Bizonyos, a makro világban elterjedt hatásos úszási mód teljesen hatástalan a mikrovilágban, és megfordítva, egészen meglepő mikroszkopikus meghajtási módok alakultak ki.

A biológiai mozgások egyik igen széles jelenségköre a kollektív mozgás, amely mind mikroszkopikus, mind makroszkopikus mérettartományban megfigyelhető. A kollektív mozgások legfőbb tulajdonsága, hogy az egyed viselkedését a "többség" hatása határozza meg – az egyed teljesen eltérő viselkedést mutat ahhoz képest, mintha "magában" lenne. E jelenség kialakulásához az szükséges, hogy nagyszámú egyed tartózkodjon egymáshoz közel s valamilyen kölcsönhatás legyen közöttük. Ilyenkor érdekes rendeződési folyamat megy végbe a teljes rendszeren, aminek során az egyedek közel egyszerre megváltoztatják a viselkedésüket és a teljes rendszerre kiterjedően kialakul egy mintázat.

A kollektív mozgások kísérleti vizsgálata kezdetben a természetben előforduló jelenségek megfigyelésével történt. Az utóbbi évtizedben a technológia fejlődése nagy változásokat hozott e vizsgálatokban. Egyrészt a fejlett helymeghatározó és mozgáskövető rendszerek, illetve az eszközök kis mérete, másrészt az önműködő mesterséges objektumok, robotok széles körű elterjedése új lendületet adott e kutatási iránynak.

A biológiai mozgások egy másik jelenségköre, és amely az utóbbi években igen intenzív kutatások tárgya, a szinkronizáció. Szinkronizáció során két, vagy több (bizonyos adott frekvenciájú) ciklikus működésű rendszer kölcsönhatása következtében az egyes rendszerek frekvenciája megváltozik és azonos frekvencián kezdenek működni. A mikrovilágban a szinkronizáció megjelenése létfontosságú a sejtek, baktériumok, mikroszkopikus élőlények helyváltoztató mozgásában vagy szerveinek működésében, konkrét példaként említhetjük a bakteriális flagellumok szinkronizált működését, vagy a sejtek csillóinak együttes mozgását, illetve a rajtuk áthaladó hullámok (metachronal wave) kialakulását.

A szinkronizációt létrehozó kölcsönhatás sokféle lehet. Számos elméleti munka szerint a mikrobiológiai rendszerekben a hidrodinamikai kölcsönhatásnak is fontos szerep juthat, azonban a „teljes kép" a szinkronizáció kialakulásának folyamatáról az alacsony Reynold számok tartományában még mindig tisztázatlan.

Az fent említett jelenségkörökben kulcsszerepe van a folyamatok kísérleti vizsgálatának, amelyek egyrészt alapul szolgálnak az elméletek létrehozásához, másrészt az elméletek ellenőrzését is a megfelelő kísérletekkel lehet elvégezni. A teljes leíráshoz szükséges kísérleteket elvileg a természetes rendszereken legjobb végezni. A természetes rendszereken végzett kísérletek azonban lényeges korlátja, hogy ezek általában nagyon bonyolultak, számos paraméterük nem ismert elegendő pontossággal. Ráadásul, a fizikai modellek ellenőrzéséhez általában szükséges a paraméterek változtatása – a természetes rendszereken erre rendszerint csak nagyon korlátozottan van lehetőség. Ilyen problémák nagyban megnehezítik a kvantitatív modellalkotást. A probléma egyik magától értetődő megoldása mesterséges kísérleti modellrendszer, robotok alkalmazása. A mozgó rendszerek részletes jellemzésében nagy segítséget nyújtanának olyan mesterséges modellek, amelyek a természetes működést lehetőleg minél több szempontból hűen reprezentálják, ugyanakkor paraméterei pontosan ismertek, változtathatók, ezáltal az elméleti modellek ellenőrizhetősége könnyebbé válik.

Célkitűzés

A dolgozatomban olyan fénnyel hajtott mikroszkopikus robotrendszerek kidolgozását tűztem ki célul, amelyek segítségével két problémakör, mégpedig a mikroszkopikus mozgás, illetve a hidrodinamikai szinkronizáció vizsgálható.

Fénnyel hajtott autonóm módon mozgó mikroszkopikus testek

A mikroszkopikus mozgás kérdéskörében olyan mozgó testeket akartam kifejleszteni, amelyeknek a mozgáshoz szükséges energiát a fény szolgáltatja, de önállóan mozognak, abban az értelemben, hogy a mozgásuk irányát nem a fény határozza meg. Ez a követelmény jelentősen eltér a fény hajtotta mozgások korábban tárgyalt eseteitől. A fény hajtotta mozgás legegyszerűbb esetében a fénnyel kölcsönható test a fény haladási irányában mozdul el. Test mozgatása lézercsipesszel is egyszerűen megoldható, ekkor viszont a lézercsipesz helyzetét mozgatják, és a megragadott test is ennek megfelelően mozog. A kifejlesztendő robotokkal szemben támasztott követelmény tehát az, hogy a mozgás irányát a robotok maguk (alakjuk, helyzetük, stb.) határozzák meg. További követelmény, hogy mozgásuk rendezett és iránytartó legyen, vagyis a mozgás pályájához rendelhető perzisztenciahossz jóval nagyobb legyen, mint a test mérete.

Kétféle mikrorobot elkészítését terveztem: az egyik típus ék alakú, és felületen történő csúszással, míg a másik guriga alakú és gördüléssel halad. A testeket kétfotonos gerjesztésű fotopolimerizációval kívántam kialakítani, majd működésük demonstrálását és a mozgásuk részletes jellemzését tűztem ki célul.

Hidrodinamikai szinkronizáció

A szinkronizáció vizsgálata során elsődleges cél a hidrodinamikai szinkronizáció demonstrálása volt a mikroszkopikus mérettartományban mesterséges objektumokkal, kontrollálható körülmények között. Ennek megvalósítására fénnyel készített és fénnyel hajtott rotorok rendszerét kívántam alkalmazni illetve továbbfejleszteni. Olyan mikrorobotokat terveztem létrehozni, amelyek fény hatására forgómozgást végeznek egy jól meghatározott helyzetű tengely körül. A rendszernek képesnek kell lenni két mikrorobot együttes vezérlésére, a relatív sebességük és helyzetük nagy pontosságú hangolására, illetve a mozgás precíz jellemzésére. A hidrodinamikai szinkronizáció demonstrálásán túl célul tűztem ki a jelenség részletes elemzését, illetve matematikai modelljének felállítását is.

Alkalmazott módszerek

Struktúrák előállítása

A kísérleteimben felhasznált összes mikrostruktúra kétfotonos polimerizációval készült és a különböző struktúrák készítése során ugyanazon lépéseket hajtottam végre. A mikrostruktúrák polimerizációja 150 μm vastag üveg fedőlemezen történt. A tisztított üvegek felületére a 16-

30 μm vastag SU8 fotopolimer réteget vittem fel spin-coat technikával. A mikrostruktúrák kialakítása során ezt a vékonyréteget világítottam meg. A kétfotonos polimerizáció céljából egy 780nm-es hullámhosszon működő femtoszekundumos lézert alkalmaztam, aminek impulzushossza 100fs, impulzusismétlési frekvenciája 100MHz volt. A nyaláb átlagos teljesítménye a fókuszáló objektív hátoldali apertúrája előtt mérve 5mW volt. A polimerizáló nyalábot egy inverz mikroszkópba vezettem be az epifluoreszcens csatlakozáson keresztül, a nyaláb fókuszálását egy 100X nagyítású nagy numerikus apertúrájú (NA=1.25) olajimmerziós objektív végezte. A polimerizáció során a mintát egy 3 dimenziós piezo pozicionáló mozgatta számítógép vezérléssel. A megvilágítást követően a mintát előhívtam

Mikrocsatornák típusai

A szerkezeteket mikrocsatornákban vizsgáltam. A munkám során két különböző típusú mikrocsatornát használtam. Az I-es típusú mikrocsatorna hordozójaként mikroszkóp fedőlemezt használtam. Az oldalfalakat két párhuzamos fedőlemez alkotta, melyeket fényre keményedő ragasztóval rögzítettem a hordozóra, illetve a csatornát felülről lezáró fedőlemezhez. A csatornát vízzel töltöttem meg, ehhez tween20 detergenst is adtam. A II-es típusú csatorna esetében függő folyadékcsepp szabad felszíne volt a mintatér alja. E kivitelnél hordozóként mélyített mintatartó résszel rendelkező mikroszkóp tárgylemezt (cavity slide) alkalmaztam. Ennek közepén egy mélyedés volt kialakítva, ebbe a mélyedésbe tettem egy vízcseppet, és ebbe a cseppbe kerültek bele a mikrostruktúrák. A kísérlet során a hordozót lefelé fordítottam, ezáltal egy függő vízcsepp alakul ki, és ekkor a gravitáció hatására a vízcsepp alján – a víz levegő határfelületnél – gyűltek össze a struktúrák.

Ékek és gurigák előkészítése és meghajtása

Abból a célból, hogy az ékek és gurigák felülete jó fényvisszaverő legyen, az előhívást követően a felületüket arannyal vontam be. A kísérleteim elvégzésére az ékek esetében I-es és II-es típusú mikrocsatornákat, míg a gurigák esetében I-es típusú mikrocsatornákat használtam.

Az ékek és gurigák mozgásának vizsgálatát egy inverz mikroszkóp segítségével végeztem el. Mindkét mikrostruktúra megvilágítására ugyanazt a lézert, egy folyamatos fényű 1070nm-es hullámhosszon működő Ytterbium szállézer fényét használtam, melynek maximális teljesítménye 10W volt. Az ékek és gurigák megvilágítására két eltérő elrendezést alkalmaztam. Ezek között a leglényegesebb különbség az volt, hogy az ékek csak egy irányból, felülről, mégpedig a mikroszkóp kondenzor lencséjén keresztül voltak megvilágítva

(felső ág), addig a gurigák két irányból, a felső ágon túl a megfigyelésre használt objektíven keresztül, alulról is meg voltak világítva (alsó ág), a két irány intenzitása közel azonos volt. A nyalábok Gauss intenzitás eloszlással rendelkeztek.

Mikrorotorok előkészítése és meghajtása

A polimerizációt követően a mikrorotorok I-es típusú mikrocsatornába kerültek.

A rotorok pozícionálására egy-egy holografikus optikai csipesszel előállított optikai csapdát alkalmaztam, ezekben lehetőség volt a pozíciók illetve a forgási sebesség nagy pontosságú hangolására. Az egyes rotorok forgási sebességét a csapdázó nyalábok intenzitása határozta meg. A két csapdázó nyaláb létrehozása és intenzitásarányának állítása a térbeli fázismodulátoron (SLM) megjelenített hologramok segítségével történt. A SLM számítógép vezérléssel, egy Labview környezetben megírt szoftver segítségével működött. A szoftver valós időben számolt hologramokat jelenített meg, ahol a hologram számolást a „superpositions of prisms and lenses" módszer segítségével végeztem el. E rendszerrel tetszőleges pontossággal tudtam az egyes csapdák helyzetét és erősségét változtatni. A rotorok átlagos forgási frekvenciája kb. 6-8 Hz volt Egy méréssorozaton belül 40-50 különböző sebességarányt állítottam be úgy, hogy a rotorok egymáshoz viszonyított sebessége a mérés végére megváltozzon (amelyik rotor a mérés elején gyorsabb volt, a végén lassabb legyen) és áthaladjon az egyenlő sebességű tartományon. Egy adott sebesség arányt tipikusan 10-40 s-ig tartottam. A mérés során a nominális sebességarányok változtatása monoton volt. Méréseimet 3 különböző rotortávolságnál végeztem el. A minimális 6μm-es távolságtól 0.5 mikronos lépésekben haladtam 7μm-ig.

A filmek kiértékelése

Az ékek és gurigák mozgásáról valamint a mikrorotorok forgásáról készült filmeket saját programokkal értékeltem ki.

Eredmények

1. Kialakítottam egy fénnyel hajtott mikrorobot/mikroúszó rendszert. A rendszerben az egyes részecskék önállóan mozognak, abban az értelemben, hogy mozgásukhoz az energiát a fényből nyerik, de mozgásuk irányára a fény nincs hatással. A részecskék fotopolimerizációval előállított ékek, amelyeket aranyréteggel vontam be. E részecskék mozgását tanulmányoztam megvilágítás hatására.

Demonstráltam, hogy e testek képesek megvilágítás hatására mozogni mind víz/üveg, mind víz/levegő határfelületen. A mozgásuk sebessége – ami tipikusan 10 μm/s – arányos a megvilágító fényforrás lokális intenzitásával, míg irányát a testek helyzete határozza meg. A mozgások pályájából kétféle módszerrel is meghatároztam az ékek mozgására jellemző perzisztencia hosszat, ez 100 – 1000 μm nagyságrendű volt. A perzisztenciahossz az ékek méreténél 1-2 nagyságrenddel nagyobb volt. **[T1]**

2. Mikroszkopikus, fénnyel hajtott autonóm módon mozgó guriga kivitelű testet készítettem, amelynek olyan az alakja, hogy a forgástengelyére merőlegesen érkező megvilágítás hatására gördülni kezd a helyzete által meghatározott irányban.

Ilyen, fotopolimerizációval előállított és aranyréteggel bevont 3 dimenziós gurigák mozgását vizsgáltam. A gurigák megvilágítására olyan optikai elrendezést alkalmaztam, amely alulról és felülről is megvilágította a gurigákat, ahol az alsó megvilágítás szerepe elsősorban a súrlódás csökkentetése volt. Kísérletekkel bebizonyítottam, hogy megfelelő alakú gurigák valóban képesek a fény által hajtott folyamatos forgásra, a megfelelő irányú mozgásra. **[T2]**

3. Elméleti bizonyítását adtam, hogy a prizmaszerű struktúrák nem képesek a forgástengelyre merőlegesen érkező homogén megvilágítás hatására folyamatosan forogni. A bizonyításban központi szerepet játszik, hogy i) veszteségmentes (lineáris) optikai rendszerben a radiancia megmaradó mennyiség, ii) egy oldalról homogén módon megvilágítva a struktúrát és körbeforgatva mechanikai hatás szempontjából ekvivalens azzal esettel, mintha izotróp sugárzási térbe helyeznénk a struktúrát. A bizonyítást mind teljesen fényvisszaverő, mind pedig átlátszó struktúra esetére elvégeztem.

A megfigyelések és bizonyítások összegzéseként az alábbi általános állítást fogalmaztam meg: Szóró testtel kölcsönható, impulzusmomentumot nem hordozó kollimált nyaláb nem hozhat létre folyamatos forgást, ha a fényszórás kétdimenziós és a kölcsönhatás veszteségmentes. A fény hajtotta forgás szükséges, de nem elegendő feltétele, hogy a fényszórás 3 dimenziós legyen. **[T2]**

4. Demonstráltam, hogy a hidrodinamikai kölcsönhatás képes vízbe merülő mikrorotorok forgását szinkronizálni. A kísérleti demonstrációban optikai csipesszel csapdázott két mikrorotor forgását elemeztem nagyon finoman szabályozott paraméterek (forgási sebesség, a rotorok egymástól mért távolsága, stb.) mellett.

Analitikus modellt dolgoztam ki a szinkronizáció modellezésére. A rotorok fáziskülönbségének dinamikáját a sztochasztikus Adler egyenlet megoldásával modelleztem, ami egy Brown részecske mozgását írja le egy döntött potenciál gödörben. A két rotor forgási fáziskülönbségeinek eloszlását a Fokker-Planck egyenlet megoldásával nyertem. **[T3]**

Publikációk listája:

Disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó publikációk:

T1. Buzás András, Kelemen Lóránd, Mathesz Anna, Oroszi László, Vizsnyiczai Gaszton, Vicsek Tamás, Ormos Pál: Light sailboats: Laser driven autonomous microrobots, Applied Physics Letters, **101,** 041111 (2012)

T2. László Oroszi, **Buzás András**, Galajda Péter, Lóránd Kelemen, Mathesz Anna, Vicsek Tamás, Vizsnyiczay Gaszton and Ormos Pál: Dimensionality constraints of light-induced rotation, Applied Physics Letters, **107**, 204106 (2015)

T3. Roberto Di Leonardo, **Buzás András**, Kelemen Lóránd, Vizsnyiczai Gaszton, Oroszi László, Ormos Pál: Hydrodynamic Synchronization of Light Driven Microrotors, Physical Review Letters, **109,** 034104, 2012

Egyéb publikációk:

Buzás, A., Geretovszky, Zs.,: Patterning ZnO layers with frequency doubled and quadrupled Nd : YAG laser for PV application, Thin Solid Films, **515,** p8495-8499 (2007)

Buzás, A., Égerházi, L., Geretovszky, Zs.: High repetition rate PLD grown titanium oxide thin films, Journal of Physics D-Applied Physics, **l41,** 085205 (2008)

Buzás, A., Geretovszky, Zs.: Nanosecond laser-induced selective removal of the active layer of CuInGaSe2 solar cells by stress-assisted ablation, Physical Review B **85** 245304, 2012

Buzás, A., Égerházi, L., and Geretovszky, Zs.:
High repetition rate PLD grown titanium oxide thin films,
E-MRS 2008 Spring Meeting, May 26 - May 30, 2008, Strasbourg, France

Konferenciák, absztraktok:

Buzás, A., Geretovszky, Zs., Németh, A., Lábadi, Z., Juhász, Gy., Major Cs., Bársony, I.:
Selective laser cutting of ZnO:Al contact layer
3BV.5.48, 24th European Photovoltaic Solar Energy Conference and Exhibition, 21 – 25 September 2009 Hamburg, Germany
Proceedings of the Proceedings of the 24th European Photovoltaic Solar Energy Conference (ISBN: 3-936338-25-6) pp. 3004 – 3006

Buzás, A., Geretovszky, Zs., Jedlinszki, N., and Galbács, G.:
On the role of the elevated temperature of the target in the enhanced emission signal in multi-pulse LIBS spectroscopy,
Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVI, 30 August – 3 September 2009, Budapest, Hungary, OL-62

Buzás, A., Oroszi, L., Kelemen, L., Ormos, P., Sasso, A.:
Micro-viscosimeter generated and manipulated by light
8th EBSA European Biophysics Congress, 23 August – 27 August 2011, Budapest, Hungary
European Biophysics Journal with Biophisics Letters **40**, S1 p226 2011

Ormos, P., **Buzás, A.**, Kelemen, L., Oroszi, L., Vizsnyicai, G., di Leonardo, R.:
Hydrodynamic synchronisation of light driven microscopic rotors
8th EBSA European Biophysics Congress, 23 August – 27 August 2011, Budapest, Hungary
European Biophysics Journal with Biophisics Letters **40**, S1 p193 2011

Kelemen, L., Aekbote, B., **Buzás, A.**, Ormos, P.:
Microtools made by two-photon polymerization for optical tweezers systems used in biological manipulation experiments
8th EBSA European Biophysics Congress, 23 – 27 August 2011, Budapest, Hungary
European Biophysics Journal with Biophisics Letters **40**, S1 p228 2011

Banas, A., Vizsnyiczai, G., **Buzás, A.**, Palima, D., Kelemen, L., Ormos, P., Gluckstad, J.:
Fabrication and optical trapping of handling structures for re-configurable microsphere magnifiers

Conference on Complex Light and Optical Forces VII part of Photonics West, 05 – 07 February 2013, San Francisco, CA
Complex Light and Optical Sources VII, Proceedings of SPIE **8637**, 86370Y 2013

Vizsnyiczai, G., Kelemen, L., Aekbote, B., **Buzás, A.**, Ormos, P.:
Indirect optical manipulation of live cells with functionalized polymer microtools
9th European-Biophysical-Societies-Association Congress, 13 – 17 July 2013, Lisbon, Portugal
European Biophysics Journal with Biophisics Letters **42**, S1 p114 2013

Oroszi, L., **Buzás, A.**, Der, A., Galajda, P., Kelemen, L., Mathesz, A., Vicsek, T., Vizsnyiczai, G., Ormos, P.:
Quasy Autonomous Microrobots Driven by Light
Conference: 58th Annual Meeting of the Biophysical-Society, 15-19 February 2014, San Francisco, CA
Biophysical Journal **106** S1 p620A 2014

Oroszi L., **Buzás A.**, Galajda P., Kelemen L., Mathesz A., Vicsek T., Vizsnyiczai G. and Ormos P.:
Conditions of Rotaion Driven by Light with no Angular Momentum
Trends in Optical Micromanipulation III, 25 - 30 January 2015, Obergurgl, Austria

Galbács, G., Kohut, A., **Buzás, A.**, Geretovszky, Z:
Temporally and spatially resolved emission spectroscopic investigation of a spark discharge plasma used for copper nanoparticle generation
European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 22-26 February 2015, Münster, Germany, **#IN3-PO06**

Oroszi L., **Buzás A.**, Galajda P., Kelemen L., Mathesz A., Vizsnyiczai G., Ormos P.:
Conditions of light induced rotation concerning the scattering process
COST Action P1205 Meeting „Advances in Optofluidics", 19-20 October 2015, Milano, Italy

Vizsnyiczai, G., Aekbote, B., **Buzás, A.**, Grexa, I., Ormos, P., Kelemen, L.:
High accuracy indirect optical manipulation of live cells with functionalized microtools

Conference on Optical Trapping and Optical Micromanipulation XIII, 28 Aug – 01 Sep 2016, San Diego, CA
Optical Trapping and Optical Micromanipulation XIII, Proceedings of SPIE **9922** UNSP 992216 2016

Vizsnyiczai, G., Aekbote, B., **Buzás, A.**, Grexa, I., Ormos, P., Kelemen, L.:
High Precision Indirect Optical Manipulation of Live Cells with Functionalised Microtools
58th Annual Meeting of the Biophysical-Society, 15-19 February 2014, San Francisco, CA
Biophysical Journal **112** S3 p582A, 2867-Pos 2017

Vizsnyiczai, G., **Buzás, A.**, Aekbote, BL., Fekete, T., Grexa, I., Ormos, P., Kelemen, L:
Application of indirect optical micromanipulation in fluorescent 3D live cell imaging
19th IUPAB Congress / 11th EBSA Congress, British Biophys Soc., 16-20 July 2017, Edinburgh, Scotland
European Biophysics Journal and Biophysics Letters **46** S1 p290, P-667 2017