

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A KÉT-FOTONOS POLIMERIZÁCIÓ ÉS A
HOLOGRAFIKUS OPTIKAI CSIPESZ
ALKALMAZÁSÁNAK ÉS TECHNIKÁJÁNAK
KÖLCSÖNÖS KITERJESZTÉSE**

SZERZŐ:

VIZSNYICZAI GASZTON

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Kelemen Lóránd

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Fizika Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged, 2019

1. Bevezetés

Tudományos munkám során két lézer alapú technika, illetve vizsgálati módszer gyakorlati megvalósításával, fejlesztésével és kísérletes felhasználásával foglalkozom. E két módszer a két-fotonos polimerizáció, mint lézeres mikrofabrikációs eljárás, és a holografikus optikai csipesz, mint lézeres mikromanipulációs vizsgálati módszer.

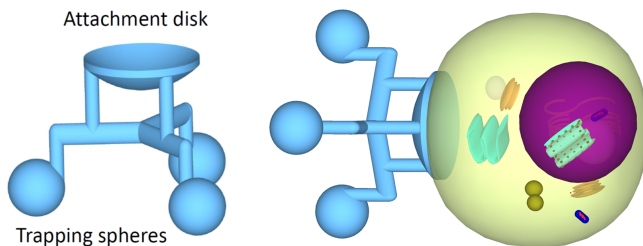
A két-fotonos polimerizáció a jelenleg legnagyobb felbontással rendelkező háromdimenziós fotolitográfias módszer. Az 1997-ben bemutatott [1] módszerrel tetszőleges alakú, szub-mikrométeres részletességű mikrostruktúrák készíthetők fényre megszilárduló, ún. fotopolimer anyagokból. Nem sokkal megszületése után demonstrálták a módszer alkalmasságát olyan mikrostruktúrák készítésére, amelyek fénynyalábokkal, a lézercsipesz optikai mikromanipulációs technikájával működtethetők [2, 3].

A lézeres optikai csipesz, az elektromágneses sugárzás impulzusból eredő erőket kihasználva, lehetővé teszi mikrométeres részecskék térbeli manipulálását, "csipeszelését" fókuszált lézernyalábokkal. A csipeszelt objektumok a csapdázó fókusz mozgásával háromdimenzióban manipulálhatóak, valamint megfelelő kalibrációkkal a rájuk ható külső erők is megmérhetőek. Az optikai csipesz olyan új biofizikai kísérleteket tett lehetővé, mint például biológiai motor fehérjék nanométeres mozgásának [4], vagy erő kifejtésének [5] megmérése, valamint DNS molekulák elasztikus tulajdonságainak meghatározása [6].

Lézercsipesz módszerének egy fontos továbbfejlesztése az ún. holografikus optikai csipesz, ami a csapdázó lézernyaláb holografikus formázásán keresztül lehetővé teszi nagy számú, háromdimenzióban függetlenül mozgatható optikai csapda létrehozását. A holografikus

optikai csipessel így lehetséges kiterjedt mikro-objektumok több ponton történő megfogása, vagy például élő sejtek precíz háromdimenziós elrendezése [7].

A két-fotonos polimerizációval megmunkált fotopolimer anyagok többsége a lézercsipessel való csapdázáshoz ideális optikai tulajdonságokkal rendelkezik. Ennek fényében több kutatócsoport is elkezdett olyan két-fotonos polimerizációval előállított mikrostruktúrák fejlesztésével foglalkozni, amelyek lézercsipessel működtethetőek, illetve új fajta kísérletek elvégzésére teszik alkalmassá az optikai csapdázást. E területen az elsők között kezdett el alkotni Ormos Pál Professzor kutatócsoportja a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetében. Doktori tanulmányaimat ezen kutatócsoportban végeztem, Dr. Kelemen Lóránd felügyelete alatt. Az általa vezetett két-fotonos polimerizációs laborban részt vettem olyan mikrostruktúrák fejlesztésében, amelyek új alkalmazásokra terjesztik ki az optikai csapdázás módszerét [8–10].



1.1. ábra. Sejtek mikrostruktúra alapú indirekt optikai manipulációjának koncepciója.

A doktori dolgozatomban bemutatott eredmények egyik fele is ebbe a sorba illik: biológiai sejtek lézercsipessel történő manipulációjának továbbfejlesztését céloztuk meg, két-fotonos polimerizációval készített mikrostruktúrák felhasználásával (1.1 ábra). Habár sejtek optikai csapdázása és manipulációja közvetlen módon is ki-

vitelezhető, a lézercsipesz nagy intenzitású fókusza gyakran káros a sejtekre, valamint a sejtek optikai jellemzői miatt a csapdázási erő is gyenge. Ezen problémák megoldására egy olyan mikrostruktúrát fejlesztettem ki, ami egy megcélzott sejthez hozzátapasztva lehetővé teszi annak lézeres károsítás nélküli, 6 szabadsági fokkal végezhető mozgatását egy holografikus optikai csipesszel.

Az ily módon megvalósított nagy precizitású, három-dimenziós indirekt sejt manipulációs módszert [11] ezután egyes sejtek többnézetű ("multiview") fluoreszcens mikroszkópiájára terveztük felhasználni. A multiview mikroszkópia módszere lehetővé teszi az optikai képalkotásra általánosan jellemző anizotrop, axiálisan gyengébb felbontás feljavítását, több különböző nézetből felvett három-dimenziós képsorozat rögzítésével és azok számítógépes összekombinálásával. A módszer kulcs eleme a minta különböző irányokból történő megfigyelésének megvalósítása, amire az általam kifejlesztett mikromanipulátor struktúrával lehetséges 6 szabadsági fokú sejt mozgatás jól alkalmazható.

A multiview mikroszkópia megvalósításához megépítettem egy fluoreszcens mikroszkóppal egybeépített holografikus optikai csipesz rendszert, valamint megírtam egy a holografikus lézercsipeszt és a mikroszkópos képalkotást szinkronban vezérlő szoftvert is. Az elkészített rendszerrel, a mikromanipulátor struktúra alkalmazásával sikeresen tudtunk egyes sejtekről több orientációban rögzíteni három-dimenziós képsorozatokat, amelyeket számítógépes feldolgozással összekombinálva a megfigyelt sejt három-dimenziós szerkezetét izotrop felbontással tudtuk rekonstruálni.

Doktori dolgozatom másik felében a két-fotonos polimerizáció (TPP) technikájának fejlesztését mutatom be. A TPP folyamata a mikrostruktúrák méretétől és összetettségétől függően néhány perctől

akár egy óráig is eltarthat, így nagy számú mikrostruktúra készítése rendkívül időigényes lehet. Ennek fényében érdemes olyan megoldásokat keresni amelyekkel felgyorsítható a TPP folyamata. E célból megvizsgáltam a holografikus lézercsipesz alapját adó, dinamikus holografikus lézernyaláb formázás alkalmazhatóságát a két-fotonos polimerizációban. Sikeresen megvalósítottam a két-fotonos polimerizáció egy olyan új módját, ahol egyes mikrostruktúrák párhuzamosan több holografikusan létrehozott és mozgatott fókuszpont által exponálódnak, így felgyorsítva a gyártási folyamatot [12].

2. Módszerek és eszközök

A holografikus két-fotonos polimerizáció megvalósításához egy térbeli fázismodulátort építettem be a kutatócsoportunk TPP rendszerébe. Továbbá, megírtam egy vezérlő programot, ami irányította az exponáló holografikus fókuszok pásztázását a térbeli fázismodulátoron megjelenített hologramok folytonos frissítésével. A szükséges hologramok számolására egy olyan optimalizált algoritmust alkalmaztam, amely ideális egyenlő intenzitású, tetszőleges három-dimenziós pozíciójú holografikus fókuszok (optikai csapdák) előállítására [13]. Az algoritmus programozásakor, annak számolási idejének lecsökkentésére az NVIDIA CUDA GPU alapú számítási technológiáját alkalmaztam.

A holografikus TPP teszt struktúráit, valamint a mikromanipulátor struktúrát az SU-8 fotopolimerből készítettem.

A mikrostruktúra alapú indirekt optikai manipulációt egy Nikon Eclipse Ti-U invertált fluoreszcens mikroszkóphoz hozzáépített holografikus optikai csipesszel végeztem. A holografikus optikai csipesz rendszer hatékony és könnyen elsajátítható működtetéséhez egy gra-

fikus kezelő felülettel ellátott szoftvert írtam. A szoftverben a holografikus TPP módszerénél már bemutatott GPU alapú hologram számolást alkalmaztam, ami lehetővé tette a holografikus csapdák valós idejű mozgását a szoftver kezelőfelületével.

A multiview mikroszkópiához epifluoreszcens felvételeket készítettem fluoreszcens golyókkal jelölt, illetve mitokondrium festett K562 sejtekről. A felvételek feldolgozását (dekonvolúció, térbeli regisztráció, fuzionálás) MATLAB-ban végeztem, saját magam által írt program szkriptekkel.

3. Összefoglalás

Doktori dolgozatomban bemutattam, hogy a két-fotonos polimerizáció technikája, valamint a holografikus optikai csipesz alkalmazása kölcsönösen kiterjeszthető: i) a két-fotonos polimerizációban kiválóan alkalmazható a holografikus optikai csipesz alapját adó, holografikus lézernyaláb formázás; ii) a holografikus optikai csipesz alkalmazása sejtek térbeli manipulációjára jelentősen továbbfejleszthető két-fotonos polimerizációval készült mikrostruktúrák felhasználásával.

[T1]: Megvalósítottam a két-fotonos polimerizáció egy olyan új módját, amely lehetővé teszi egyes mikrostruktúrák párhuzamosan több fókuszpont általi polimerizációját, felgyorsítva a gyártási folyamatot. Ehhez a holografikus lézernyaláb formázás technikáját alkalmaztam: egy térbeli fázismodulátorral a TPP rendszer lézernyalábját több holografikus nyalábra osztottam, amelyeket különálló fókuszokba képez le a rendszer fókuszáló objektíve. Az így létrehozott többszörös fókuszok koordinált mozgására egy vezérlő szoftvert írtam, amely a rendszerbe épített SLM saját frissítésével szinkronban változtatja a nyalábosztó hologramot. A hologramok számolására egy

optimalizált algoritmust alkalmaztam, amellyel közel egyforma intenzitású holografikus fókuszok állíthatóak elő precíz három-dimenziós koordinátákban. A módszert olyan mikrostruktúrák gyártásával teszteltem, amelyeket párhuzamosan 5 holografikus fókusz exponált. A leggyártott mikrostruktúrákon végzett mérések eredményei alapján kijelenthető, hogy a holografikusan létrehozott és mozgatott fókuszok kiválóan alkalmazhatóak a két-fotonos polimerizációban. A módszerrel $9\ \mu\text{m/s}$ pásztázási sebességet értem el, de egy nagyobb frissítési frekvenciájú SLM-mel ez akár egy nagyságrenddel is nagyobb lehet.

[T2]: Kifejlesztettem egy olyan, két-fotonos polimerizációval készülő mikrostruktúrát, amely alkalmazásával a biológiai sejtek optikai manipulációjának módszere jelentősen feljavítható. A holografikus optikai csipesszel megfogható, biokémiaailag funkcionizált mikromanipulátor struktúrához könnyedén hozzátapasztatható egy kiválasztott sejt. A mikromanipulátor, optimális alakjának és törésmutatójának köszönhetően, lehetővé teszi a megfogott sejt nagy stabilitású, 6 szabadsági fokú térbeli manipulációját, miközben elkerüli a sejt érintkezését a holografikus optikai csipesz nagy intenzitású lézernyalábjaival. A csapdázott sejt laterális térbeli fluktuációja (x : 90 nm, y : 150 nm) megfelelően alacsony ahhoz, hogy elmosódás mentesen lehessen akár hosszú expozíciós idejű felvételeket is készíteni a sejtről. Mindez együttesen jelentős előrelépés a sejtek optikai manipulációjának korábbi módjaihoz képest.

[T3]: Sikeresen alkalmaztam a mikromanipulátor struktúrát sejtek multiview mikroszkópiájának kivitelezésére. Ehhez megépítettem egy fluoreszcens mikroszkóppal kombinált holografikus optikai csipesz rendszert. A holografikus optikai manipuláció és a multiview képalkotás irányítására egy saját szoftvert írtam. A multiview képalkotás jellemzése után demonstráltam, hogy a módszerrel közel izot-

rop felbontással rekonstruálható egy sejt három-dimenziós szerkeze-
te.

Publikációs lista

<https://scholar.google.hu/citations?user=hcgq8uwAAAAJ>

1. Lóránd Kelemen, Pál Ormos, and Gaszton Vizsnyiczai. Two-photon polymerization with optimized spatial light modulator. *Journal of the European Optical Society-Rapid publications*, 6, 2011.
2. R Di Leonardo, András Búzás, Lóránd Kelemen, Gaszton Vizsnyiczai, László Oroszi, and Pál Ormos. Hydrodynamic synchronization of light driven microrotors. *Physical Review Letters*, 109(3):034104, 2012.
3. Darwin Palima, Andrew Rafael Bañas, Gaszton Vizsnyiczai, Lóránd Kelemen, Pál Ormos, and Jesper Glückstad. Wave-guided optical waveguides. *Optics Express*, 20(3):2004–2014, 2012.
4. Anrdás Búzás, Lóránd Kelemen, Anna Mathesz, László Oroszi, Gaszton Vizsnyiczai, Tamás Vicsek, and Pál Ormos. Light sail-boats: Laser driven autonomous microrobots. *Applied Physics Letters*, 101(4):041111, 2012.

5. Darwin Palima, Andrew Rafael Bañas, Gaszton Vizsnyiczai, Lóránd Kelemen, Thomas Aabo, Pál Ormos, and Jesper Glückstad. Optical forces through guided light deflections. *Optics Express*, 21(1):581–593, 2013.
6. **[T1] Gaszton Vizsnyiczai, Lóránd Kelemen, and Pál Ormos. Holographic multi-focus 3d two-photon polymerization with real-time calculated holograms. *Optics Express*, 22(20):24217–24223, 2014.**
7. Gaszton Vizsnyiczai, Tamás Lestyán, Jaroslava Joniova, Badri L. Aekbote, Alena Strejčková, Pál Ormos, Pavol Miskovsky, Lóránd Kelemen, and Gregor Bánó. Optically trapped surface-enhanced raman probes prepared by silver photoreduction to 3D microstructures. *Langmuir*, 31(36):10087–10093, 2015.
8. László Oroszi, András Búzás, Péter Galajda, Lóránd Kelemen, Anna Mathesz, Tamás Vicsek, Gaszton Vizsnyiczai, and Pál Ormos. Dimensionality constraints of light-induced rotation. *Applied Physics Letters*, 107(20):204106, 2015.
9. Badri L Aekbote, Tamás Fekete, Jaroslaw Jacak, Gaszton Vizsnyiczai, Pál Ormos, and Lóránd Kelemen. Surface-modified complex su-8 microstructures for indirect optical manipulation of single cells. *Biomedical Optics Express*, 7(1):45–56, 2016.
10. Silvio Bianchi, Riccardo Pruner, Gaszton Vizsnyiczai, Claudio Maggi, and Roberto Di Leonardo. Active dynamics of colloidal particles in time-varying laser speckle patterns. *Scientific Reports*, 6:27681, 2016.

11. [T2] Gaszton Vizsnyiczai, Badri L Aekbote, András Buzás, István Grexa, Pál Ormos, and Lóránd Kelemen. High accuracy indirect optical manipulation of live cells with functionalized microtools. In *Optical Trapping and Optical Micromanipulation XIII*, volume 9922, page 992216. International Society for Optics and Photonics, 2016.
12. Gaszton Vizsnyiczai, Giacomo Frangipane, Claudio Maggi, Filippo Saglimbeni, Silvio Bianchi, and Roberto Di Leonardo. Light controlled 3d micromotors powered by bacteria. *Nature Communications*, 8:15974, 2017.
13. Giacomo Frangipane, Dario Dell’Arciprete, Serena Petracchini, Claudio Maggi, Filippo Saglimbeni, Silvio Bianchi, Gaszton Vizsnyiczai, Maria Lina Bernardini, and Roberto Di Leonardo. Dynamic density shaping of photokinetic E. coli. *Elife*, 7:e36608, 2018.
14. Silvio Bianchi, Gaszton Vizsnyiczai, Stefano Ferretti, Claudio Maggi, and Roberto Di Leonardo. An optical reaction microturbine. *Nature Communications*, 9(1):4476, 2018.
15. Giacomo Frangipane, Gaszton Vizsnyiczai, Claudio Maggi, Romolo Savo, Alfredo Sciortino, Sylvain Gigan, and Roberto Di Leonardo. Invariance properties of bacterial random walks in complex structures. *Nature Communications*, 10(1):2442, 2019.
16. [T3] Gaszton Vizsnyiczai, András Buzás, Badri L Aekbote, Tamás Fekete, István Grexa, Pál Ormos, and Lóránd Kelemen. Multiview microscopy of single cells th-

rough microstructure-based indirect optical manipulation. Elérhető az arXiv preprint szerveren (arxiv.org).

Irodalomjegyzék

- [1] Shoji Maruo, Osamu Nakamura, and Satoshi Kawata. Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Opt. Lett.*, 22(2):132–134, Jan 1997.
- [2] Péter Galajda and Pál Ormos. Complex micromachines produced and driven by light. *Applied Physics Letters*, 78(2):249–251, 2001.
- [3] Satoshi Kawata, Hong-Bo Sun, Tomokazu Tanaka, and Kenji Takada. Finer features for functional microdevices. *Nature*, 412(6848):697–698, August 2001.
- [4] Karel Svoboda, Christoph F. Schmidt, Bruce J. Schnapp, and Steven M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365:721–, October 1993.
- [5] J. E. Molloy, J. E. Burns, J. Kendrick-Jones, R. T. Tregear, and D. C. S. White. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*, 378:209–, November 1995.
- [6] Steven B. Smith, Yujia Cui, and Carlos Bustamante. Overs-tretching b-dna: The elastic response of individual double-

- stranded and single-stranded dna molecules. *Science*, 271(5250):795–799, 1996.
- [7] G M Akselrod, W Timp, U Mirsaidov, Q Zhao, C Li, R Timp, K Timp, P Matsudaira, and G Timp. Laser-guided assembly of heterotypic three-dimensional living cell microarrays. *Biophysical journal*, 91(9):3465–3473, November 2006.
- [8] D. Palima, A. R. Bañas, G. Vizsnyiczai, L. Kelemen, P. Ormos, and J. Glückstad. Wave-guided optical waveguides. *Opt. Express*, 20(3):2004–2014, Jan 2012.
- [9] Darwin Palima, Andrew Rafael Bañas, Gaszton Vizsnyiczai, Lóránd Kelemen, Thomas Aabo, Pál Ormos, and Jesper Glückstad. Optical forces through guided light deflections. *Opt. Express*, 21(1):581–593, Jan 2013.
- [10] Gaszton Vizsnyiczai, Tamás Lestyán, Jaroslava Joniova, Badri L. Aekbote, Alena Strejčková, Pál Ormos, Pavol Miskovsky, Lóránd Kelemen, and Gregor Bánó. Optically trapped surface-enhanced raman probes prepared by silver photoreduction to 3D microstructures. *Langmuir*, 31(36):10087–10093, 2015. PMID: 26292094.
- [11] Gaszton Vizsnyiczai, Badri L Aekbote, András Buzás, István Grexa, Pál Ormos, and Lóránd Kelemen. High accuracy indirect optical manipulation of live cells with functionalized microtools. In *Optical Trapping and Optical Micromanipulation XIII*, volume 9922, page 992216. International Society for Optics and Photonics, 2016.

- [12] Gaszton Vizsnyiczai, Lóránd Kelemen, and Pál Ormos. Holographic multi-focus 3D two-photon polymerization with real-time calculated holograms. *Opt. Express*, 22(20):24217–24223, Oct 2014.
- [13] Roberto Di Leonardo, Francesca Ianni, and Giancarlo Ruocco. Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays. *Opt. Express*, 15(4):1913–1922, Feb 2007.