



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

**ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΛΕΠΤΩΝ  
ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ  
ΝΑΝΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΠΑΥΛΗ ΠΑΓΩΝΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:  
ΔΗΜΟΤΙΚΑΛΗ ΔΗΜΗΤΡΑ**

ΑΘΗΝΑ 2012



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Δ. Δημοτίκαλη**, Καθηγήτρια ΕΜΠ

**Θ. Θεοδώρου**, Καθηγητής ΕΜΠ

**Π. Αργεΐτης**, Διευθυντής Ερευνών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Δ. Δημοτίκαλη**, Καθηγήτρια ΕΜΠ

**Θ. Θεοδώρου**, Καθηγητής ΕΜΠ

**Π. Αργεΐτης**, Διευθυντής Ερευνών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

**Α. Ανδρεόπουλος**, Καθηγητής ΕΜΠ

**Δ. Τσαμάκης**, Καθηγητής ΕΜΠ

**Δ. Τσουκαλάς**, Καθηγητής ΕΜΠ

**Κ. Χαριτίδης**, Καθηγητής ΕΜΠ

---

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.  
(Ν. 5343/1932, Άρθρο 202)



Στην οικογένειά μου,



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος” σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ίδιου Ερευνητικού Κέντρου και τον Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για την Υποτροφία Εσωτερικού που έλαβα για την εκπόνηση της Διδακτορικής μου Διατριβής κατά το χρονικό διάστημα 2006-2009.

Θα ήθελα να εκφράσω το σεβασμό μου στην Καθηγήτρια Δ. Δημοτικάλη της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, η οποία είναι η Επιβλέπουσα Καθηγήτρια της Διδακτορικής Διατριβής. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή επίβλεψη και την πολύτιμη βοήθειά της στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου της Διδακτορικής Διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμησή μου στον επιβλέποντα της Διδακτορικής Διατριβής στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος” Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας Π. Αργεΐτη για την επιστημονική του ιδιοφυΐα και εφευρετικότητα, η οποία ήταν το κίνητρο για να διευρύνω την αντίληψή μου και τις γνώσεις μου. Επίσης τον ευχαριστώ για όλα όσα έμαθα κατά τη διάρκεια της Διδακτορικής μου Διατριβής και για τις υποδείξεις του, οι οποίες βοήθησαν πολύ στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου της Διδακτορικής Διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή Θ. Θεοδώρου για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της Διδακτορικής μου Διατριβής και την άμεση ανταπόκρισή του σε οτιδήποτε ήταν απαραίτητο για τη διεξαγωγή και την ολοκλήρωση της Διδακτορικής Διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ τον Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας Σ. Κακαμπάκο και την Ερευνήτρια Β΄ Βαθμίδας Π. Πέτρου για την συνεργασία τους για το βιολογικό κομμάτι της εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, για τις παρατηρήσεις τους στη συγγραφή των αποτελεσμάτων και για την άδεια που μου παρείχαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που σχετίζονται με την πρόσδεση πρωτεϊνών στο Εργαστήριο Ανοσοανάλυσεων και Ανοσοαισθητήρων του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”. Επίσης, ευχαριστώ την Ερευνήτρια Β΄ Βαθμίδας Π. Πέτρου για την παρασκευή της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Ευχαριστώ την Δρ. Α. Μπούρκουλα για την καλλιέργεια των κυττάρων, για τα πειράματα ανοσοκυτταρολογίας και για τις μέτρησεις της πιστότητας σε επιφάνειες που παρασκεύασα μέσω της φωτολιθογραφικής διεργασίας της PVA καθώς και για τις διορθώσεις στη συγγραφή των αποτελεσμάτων που σχετίζονταν με τη σχηματοποίηση κυττάρων.

Ευχαριστώ τον Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας Δ. Κλέτσα του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος” και την ομάδα του για τους ινοβλάστες που απομονώθηκαν από φυσιολογικό ανθρώπινο ιστό δέρματος και ελήφθησαν από τη Δρ. Α. Μπούρκουλα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ακινητοποίηση και η χρώση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος ινοβλαστών σε επιφάνειες που παρασκεύασα (υμένιο διασταυρωμένης PVA και σχηματοποιημένες επιφάνειες Si μέσω φωτολιθογραφημένου υμενίου PVA). Οι ινοβλάστες έχουν απομονωθεί μετά από έγκριση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κ. Διακουμάκο για την σύνθεση των ακρυλικών τετραπολυμερών RHETIMA 1 και RHETIMA 2 που χρησιμοποιήθηκαν

στη Διδακτορική Διατριβή. Ευχαριστώ τον Δρ. Α. Δούβα και την Δρ. Μ. Χατζηχρηστίδη για τη εκπαίδευσή μου στο Εργαστήριο Χημείας του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”. Τον Δρ. Α. Δούβα τον ευχαριστώ για την παραχώρηση ποσότητας της πολυοξομεταλλικής ένωσης 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο για την πραγματοποίηση πειραμάτων, τα οποία παρουσιάζονται στη Διδακτορική Διατριβή. Την Δρ. Μ. Χατζηχρηστίδη την ευχαριστώ για την έκθεση του υμενίου AZ5214, που την πραγματοποίησε ως πιστοποιημένος χρήστης του ευθυγραμμιστή μασκών MA6, προκειμένου να πραγματοποιηθεί λιθογραφία αρνητικού τόνου της AZ5214. Ευχαριστώ τον Δρ. Β. Βαμβακά για την εκπαίδευση μου στο φασματοφωτόμετρο υπερύθρου. Ευχαριστώ την Ερευνήτρια Γ΄ Βαθμίδας Ε. Μακαρώνα για τη λήψη των εικόνων AFM. Επίσης, ευχαριστώ την Δρ. Δ. Νιάκουλα για την βοήθεια της στην κλασμάτωση της εποξειδικής ρητίνης.

Ευχαριστώ τον Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας Ε. Γογγολίδη και την Ερευνήτρια Β΄ Βαθμίδας Α. Τσερέπη για την άδεια χρήσης του οργάνου μέτρησης γωνιών επαφής. Ευχαριστώ την Δρ. Π. Μπαγιάτη για την εκπαίδευση μου στη μέτρηση των γωνιών επαφής.

Ευχαριστώ την Ε. Τσώη υπεύθυνη του Καθαρού Χώρου του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής για τη χορήγηση άδειας χρήσης του καθαρού χώρου και για την βοήθειά της. Επίσης ευχαριστώ όλους τους τεχνικούς του καθαρού χώρου για τη βοήθειά τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την πραγματοποίηση μετρήσεων που έγιναν εκτός του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”, τον Ν. Χατζόπουλο και την Π.-Κ. Ρεβέλου για τις μετρήσεις ιξώδους που πραγματοποιήθηκαν στην εταιρεία Spectrum Labs που βρίσκεται στον Πειραιά και τον Καθηγητή Andrzej Budkowski για τα φάσματα μάζας δευτερογενών ιόντων ως προς το χρόνο πτήσης που πραγματοποιήθηκαν στην Πολωνία στο Ινστιτούτο Φυσικής M. Smoluchowski του Πανεπιστημίου Jagiellonian, το οποίο βρίσκεται στην Κρακοβία.

Τέλος ευχαριστώ εγκάρδια την οικογένειά μου για τη στήριξή τους, που μου επέτρεψε την επιτυχή διεκπεραίωση των σπουδών μου.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	1
SUMMARY .....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	5
<b>A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	7
1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΤΕΡΕΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ .....	7
1.1. Υλικά τροποποίησης στερεών επιφανειών .....	8
1.1.1. Αυτοοργανωμένα Μονομοριακά Στρώματα (ΑΜΣ) .....	8
1.1.2. Πολυμερικά υμένια .....	10
1.1.2.1. Επίστρωση μέσω περιστροφής .....	10
1.1.2.2. Χημική πρόσδεση πολυμερικών αλυσίδων .....	11
1.1.2.2.1. Πρόσδεση υπερδιακλαδωμένων πολυμερικών υμενίων .....	12
1.1.2.3. Σχηματισμός υμενίου με εμβάπτιση .....	14
1.2. Μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνών που έχουν προσροφηθεί σε στερεές επιφάνειες .....	14
1.3. Ακινητοποίηση πρωτεϊνών στις τροποποιημένες στερεές επιφάνειες .....	18
1.3.1. Χημική πρόσδεση .....	20
1.3.2. Φυσική προσρόφηση .....	21
1.3.3. Αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών .....	22
1.4. Προσκόλληση κυττάρων στις στερεές επιφάνειες .....	24
1.5. Αναγκαιότητα για επιλεκτική πρόσδεση βιολογικού υλικού .....	25
2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΙΘΟΓΡΑΦΙΑΣ .....	26
2.1. Φωτολιθογραφία .....	26
2.1.1. Συστήματα εκτύπωσης .....	28
2.1.1.1. Εκτύπωση επαφής .....	28
2.1.1.2. Εκτύπωση γειννίασης .....	28
2.1.1.3. Εκτύπωση προβολής .....	29
2.1.2. Πηγές έκθεσης που χρησιμοποιούνται στη φωτολιθογραφία .....	31
2.2. Φωτοευαίσθητα λιθογραφικά υλικά που χρησιμοποιούνται στη φωτολιθογραφία .....	32
2.2.1. Χαρακτηριστικά μεγέθη των φωτοευαίσθητων πολυμερικών υμενίων .....	32
2.2.2. Μηχανισμοί αλλαγής διαλυτότητας .....	34
2.2.3. Συστατικά φωτοευαίσθητων υμενίων .....	35
2.2.3.1. Φωτοευαίσθητα λιθογραφικά υλικά .....	35
2.2.3.1.1. Φωτοευαίσθητα λιθογραφικά υλικά που στηρίζονται στις διαζωναφθοκινόνες .....	35
2.2.3.1.2. Υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης .....	39
2.2.3.1.2.1. Φωτοπαραγωγοί οξέος .....	40
2.2.3.1.2.2. Εποξειδικές ρητίνες .....	42
2.2.3.1.3. Οι πολυοξομεταλλικές ενώσεις ως φωτοοξειδωτές και φωτοευαίσθητοποιητές σε λιθογραφικά υλικά .....	43
2.3. Εναλλακτικές τεχνικές λιθογραφίας .....	48
2.3.1. Εγγραφή με μικροεπαφή .....	48
2.3.2. Λιθογραφία νανοαποτυπώματος .....	49
2.3.3. Λιθογραφία με ακίδες σάρωσης .....	50
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	50
3.1. Σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων μέσω φωτοκαθοδηγούμενων μεθόδων .....	50
3.1.1. Η τεχνική της αποκόλλησης .....	51
3.1.2. Επιλεκτική τροποποίηση φωτοευαίσθητων ομάδων .....	55
3.1.3. Επιλεκτική τροποποίηση φωτοευαίσθητων πολυμερών .....	58
3.2. Σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων μέσω εύπλαστης λιθογραφίας ή μέσω λιθογραφίας νανοαποτυπώματος .....	64
3.3. Σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων μέσω λιθογραφίας με ακίδες σάρωσης .....	68
<b>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	73
1. ΥΛΙΚΑ .....	73
1.1. Διαλύτες .....	73
1.2. Πολυμερή .....	73
1.3. Φωτοευαίσθητοποιητές .....	74
1.4. Βιομόρια και βιολογικό υλικό (κύτταρα) .....	75
1.5. Διαλύματα .....	76

1.6. Τροποποίηση της επιφάνειας του πυριτίου για την πρόσδεση βιολογικού υλικού.....	77
1.6.1. Σιλάνια .....	77
1.6.2. Εποξειδική ρητίνη EPR.....	77
1.6.2.1. Κλασμάτωση του πολυμερούς Epikote 164 για την παρασκευή εποξειδικής ρητίνης EPR.....	78
1.7. Διαλύματα για τον καθαρισμό των δισκίων πυριτίου.....	79
1.8. Ρυθμιστικά διαλύματα .....	79
1.8.1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων.....	79
1.8.2. Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων .....	79
2. ΟΡΓΑΝΑ .....	79
2.1. Όργανα φασματοσκοπίας .....	79
2.1.1. Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού .....	79
2.1.2. Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου .....	80
2.2. Προφιλόμετρο ακίδας.....	81
2.3. Όργανο μέτρησης της γωνίας επαφής.....	81
2.4. Μικροσκόπιο φθορισμού με ανάκλαση.....	82
2.5. Ξωδόμετρο .....	82
2.6. Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στη λιθογραφική διεργασία.....	83
2.6.1. Μηχανικός περιστροφικός επιστρωτής.....	83
2.6.2. Συστήματα έκθεσης.....	83
2.6.3. Θερμαινόμενες πλάκες.....	83
2.7. Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων.....	83
2.8. Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης.....	85
3. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ .....	86
3.1. Λιθογραφική διεργασία .....	86
3.1.1. Επίστρωση.....	86
3.1.2. Θερμική κατεργασία μετά την επίστρωση .....	86
3.1.3. Έκθεση.....	86
3.1.4. Θερμική κατεργασία μετά την έκθεση.....	86
3.1.5. Εμφάνιση.....	87
3.2. Διεργασία τροποποίησης της επιφάνειας του πυριτίου με APTES.....	87
3.3. Διεργασία για την ακινητοποίηση της βιοτίνης και των παραγώγων της.....	87
3.4. Διεργασία για την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός.....	87
3.5. Διεργασία για την ακινητοποίηση αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού επισημασμένου με φθορίζουσα ουσία .....	88
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>89</b>
1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΧΡΗΣΗΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ .....	89
1.1. Καθοδήγηση της χημικής πρόσδεσης της βιοτίνης μέσω φωτολιθογραφικής διεργασίας αποκόλλησης (lift-off) .....	90
1.1.1. Επιλογή συστήματος .....	90
1.1.2. Τροποποίηση της επιφάνειας πυριτίου με Αυτοοργανωμένο Μονομοριακό Στρώμα αμινοσιλανίου .....	92
1.1.3. Μελέτη της λιθογραφίας του φωτοευαίσθητου υμενίου πάνω στο ΑΜΣ αμινοσιλανίου ....	94
1.2. Διεργασία για τη σχηματοποίηση της βιοτίνης σε φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο.....	96
1.2.1. Επιλογή συστήματος .....	96
1.2.2. Μελέτη της λιθογραφίας της εποξειδικής ρητίνης EPR και βελτιστοποίησή της .....	100
1.2.3. Πρόσδεση της βιοτίνης σε φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR.....	102
1.2.4. Κατασκευή μικροδομών βιοτίνης και μικροδομών του ισοθειοκυανικού άλατος της φθορεσκεΐνης.....	104
1.2.5. Μελέτη της αντίδρασης του θεικού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με τη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR .....	105
2. ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΣΩ ΥΛΙΚΟΥ ΠΟΥ ΑΠΟΤΡΕΠΕΙ ΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ .....	111
2.1. Τροποποίηση της επιφάνειας της εποξειδικής ρητίνης για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών.....	112
2.1.1. Επιλογή συστήματος .....	112
2.1.2. Αποτροπή προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε τροποποιημένα υμένα της εποξειδικής ρητίνης .....	112

2.2. Μελέτη υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών .....	118
2.2.1. Επιλογή συστήματος .....	118
2.2.2. Ανάπτυξη φωτολιθογραφικής μεθόδου με βάση την πολυ(βινυλική αλκοόλη) για εφαρμογή σε βιοαναλυτικές διεργασίες.....	119
2.2.2.1. Σύγκριση υμενίων διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης).....	120
2.2.2.1.1. Επιλογή του ποσοστού υδρόλυσης της πολυ(βινυλικής αλκοόλης).....	120
2.2.2.1.2. Περιεκτικότητα των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) σε 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ.....	121
2.2.2.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος στο ιξώδες του φωτοευαίσθητου διαλύματος πολυ(βινυλικής αλκοόλης) .....	124
2.2.2.3. Απομάκρυνση του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος κατά τη διάρκεια της εμφάνισης.....	125
2.2.2.3.1. Εμφάνιση με απιονισμένο νερό.....	127
2.2.2.3.2. Εμφάνιση με υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου.....	130
2.2.2.3.3. Εμφάνιση με μεθανόλη-νερό.....	132
2.2.2.3.4. Συνολικά όλοι οι εμφανιστές.....	133
2.2.2.4. Τραχύτητα των υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης).....	134
2.2.2.5. Βελτιστοποίηση του σταδίου της έκθεσης.....	137
2.2.2.6. Προκαταρκτική μελέτη της αποτροπής της προσρόφησης πρωτεϊνών σε υμένια διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης) .....	138
2.2.2.7. Προτεινόμενη λιθογραφική διεργασία για τη σχηματοποίηση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) με σκοπό την εφαρμογή της σε βιοαναλυτικές διεργασίες.....	140
2.2.3. Μελέτη υποστρωμάτων για τη φυσική προσρόφηση πρωτεϊνών.....	141
2.2.3.1. Υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης (AZ5214).....	141
2.2.3.1.1. Φωτολιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) πάνω σε υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης.....	143
2.2.3.1.2. Επίδραση του χρόνου γήρανσης των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) στις ιδιότητες των υποκείμενων υποστρωμάτων AZ5214.....	145
2.2.3.2. Αυτοοργανωμένο μονομοριακό στρώμα 3-αμινοπροπυλο τριαιθοξυ σιλανίου (APTES).....	154
2.2.3.3. Υμένιο πολυστυρενίου .....	157
2.2.3.3.1. Μελέτη της επίδρασης της λιθογραφικής διεργασίας του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA στο υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου.....	157
2.2.3.3.2. Σχηματοποίηση πρωτεϊνών.....	164
2.2.3.4. Υμένιο εποξειδικής ρητίνης.....	167
2.2.3.4.1. Μελέτη της επίδρασης του φωτοευαίσθητου υμενίου πολυ(βινυλικής αλκοόλης), χρησιμοποιώντας το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ως φωτοευαίσθητη ουσία στην εποξειδική ρητίνη.....	168
2.2.3.4.2. Μελέτη της επίδρασης του φωτοευαίσθητου υμενίου πολυ(βινυλικής αλκοόλης) χρησιμοποιώντας το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ως φωτοευαίσθητη ουσία.....	171
2.2.3.4.3. Εμβολισμός αλυσίδων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών.....	175
3. ΚΑΘΟΔΗΓΟΥΜΕΝΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΩΤΟΠΟΛΥΜΕΡΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	185
3.1. Επιλογή συστήματος.....	185
3.2. Επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα με ιδιότητες αστροκυττάρων .....	186
3.3. Επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου.....	201
3.4. Επιλεκτική προσκόλληση ινοβλαστών από φυσιολογικό ανθρώπινο ιστό δέρματος.....	205
<b>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	209
<b>Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	217
1. Σύνθεση των ακρυλικών τετραπολυμερών.....	217
2. Παρασκευή 18-βολφραμοδιφωσφορικού αμμωνίου ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> P <sub>2</sub> W <sub>18</sub> O <sub>62</sub> ).....	217
3. Διεργασία για την παρασκευή της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός.....	217

4. Διεργασίες για την ακινητοποίηση και τη χρώση των κυττάρων .....	218
4.1. Διεργασία για την ακινητοποίηση καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς U-87MG που προέρχονται από ανθρώπινο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα .....	218
4.2. Χρώση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των κυττάρων U-87MG .....	218
4.3. Διεργασία για την ακινητοποίηση του κολλαγόνου .....	219
4.4. Διεργασία για την ακινητοποίηση καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς PC-12 που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου .....	219
4.5. Χρώση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των διαφοροποιημένων κυττάρων PC-12 .....	220
4.6. Διεργασία για την ακινητοποίηση ινοβλαστών .....	220
4.7. Χρώση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των ινοβλαστών.....	221
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	223
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	229

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### «Φωτοχημική Τροποποίηση Λεπτών Πολυμερικών Υμενίων για Εφαρμογές στη Νανοβιοτεχνολογία»

Κατά τη διάρκεια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής διερευνήθηκαν δυνατότητες χρησιμοποίησης υμενίων φωτολιθογραφικών υλικών για τη σχηματοποίηση μικρών βιομορίων, πρωτεϊνών και κυττάρων και αναπτύχθηκαν μέθοδοι για την επίτευξη αυτού του σκοπού. Επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση πολυμερικών υμενίων, επειδή αυτά είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα Αυτοοργανωμένα Μονομοριακά Στρώματα και είναι εύκολο να σχηματοποιηθούν με τροποποίηση καθιερωμένων τεχνικών φωτολιθογραφίας. Οι προτεινόμενες προσεγγίσεις έχουν τα πλεονεκτήματα των μεθόδων που στηρίζονται στη φωτολιθογραφία δηλαδή υψηλή ακρίβεια, επαναληψιμότητα, δυνατότητα χρήσης σε διάφορα υποστρώματα και εύκολη ενσωμάτωση σε διεργασίες κατασκευής Μικροσυστοιχιών και Βιο-Μικροηλεκτρομηχανικών Συστημάτων και γενικότερα σε διεργασίες μαζικής παραγωγής.

Στο πρώτο μέρος της Διδακτορικής Διατριβής επιτεύχθηκε η ανάπτυξη διεργασίας για τη σχηματοποίηση βιομορίων με χημική πρόσδεση σε σχηματοποιημένο λιθογραφικό υμένιο εποξειδικής ρητίνης. Η καινοτομία αυτής της προσέγγισης έγκειται στο γεγονός ότι η τροποποίηση της επιφάνειας για την ομοιοπολική πρόσδεση των βιομορίων και η φωτολιθογραφία επιτελούνται από το ίδιο υλικό οδηγώντας σε μία μη χρονοβόρα διεργασία ενός σταδίου. Παράλληλα, αξιολογείται η δυνατότητα λιθογραφίας υψηλής διακριτικής ικανότητας που παρέχει το φωτολιθογραφικό υλικό που επιλέχθηκε, το οποίο ήταν εποξειδική ρητίνη που περιείχε φωτοπαραγωγό οξέος. Ο θεϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης βρέθηκε ότι αντιδρά εύκολα με τους εποξειδικούς δακτυλίους στις σχηματοποιημένες δομές, ενώ η πρόσδεση της βιοτίνης στη σχηματοποιημένη εποξειδική ρητίνη ήταν αμελητέα, αποκλείοντας την πιθανότητα φυσικής προσρόφησης του θεϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης. Χρησιμοποιώντας έκθεση στο βαθύ υπεριώδες και εκτύπωση επαφής με βελτιστοποίηση της λιθογραφικής διεργασίας κατασκευάστηκαν συστοιχίες του θεϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης μέχρι 0.5 μm στις οποίες ακινητοποιήθηκε επιτυχώς στρεπταβιδίνη.

Στο δεύτερο μέρος της Διδακτορικής Διατριβής ένα φωτολιθογραφικά σχηματοποιήσιμο υλικό, το οποίο ανθίσταται στην προσρόφηση πρωτεϊνών και στην προσκόλληση κυττάρων, αξιοποιήθηκε για την επιλεκτική ακινητοποίησή τους. Η διεργασία αυτή βασίζεται στη σχηματοποίηση υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (poly(vinyl alcohol), PVA) μέσω φωτοχημικά προκαλούμενης διασταύρωσης. Η φωτολιθογραφική διεργασία η οποία έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν για λιθογραφία στο βαθύ υπεριώδες τροποποιήθηκε έτσι ώστε να καταστεί κατάλληλη για βιο-εφαρμογές. Η διασταυρωμένη PVA ανθίσταται στην προσρόφηση των πρωτεϊνών ακόμα και μετά από επώαση 22 ωρών σε διάλυμα πρωτεϊνών. Για την επίτευξη της επιλεκτικής σχηματοποίησης πρωτεϊνών μέσω της φωτολιθογραφικής διεργασίας της PVA επιλέχθηκε το πολυστυρένιο ως πιο κατάλληλο πολυμερικό υπόστρωμα. Ακολουθώντας την προτεινόμενη φωτολιθογραφική διεργασία κατασκευάστηκαν δομές μέχρι 2.5 μm. Οι σχηματοποιημένες επιφάνειες εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα πρωτεϊνών και παρατηρήθηκε ότι οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται μόνο στις περιοχές του πολυστυρενίου, ενώ δεν προσροφώνται στις δομές της PVA. Στη συνέχεια εφαρμόζοντας τη σχηματοποίηση της PVA επιτεύχθηκε η επιλεκτική προσκόλληση

κυττάρων σε κατάλληλα υποστρώματα. Βρέθηκε ότι τα κύτταρα προσκολλώνται επιλεκτικά στις περιοχές που έχουν αποκαλυφθεί μετά τη φωτολιθογραφία της PVA, ενώ δεν προσκολλώνται στις δομές της PVA.

Λέξεις κλειδιά: φωτολιθογραφία, μικροδομές, πολυμερικά υμένα, εποξειδική ρητίνη, πολυ(βινυλική αλκοόλη), πρωτεΐνες, βιομόρια, κύτταρα

# SUMMARY

## «Photochemical Modification of Thin Polymeric Films for Applications in Nano-biotechnology»

In the context of this PhD thesis, routes for the application of photolithographic polymeric materials films in patterning of small biomolecules, proteins and cells were investigated and methods for achieving this goal were developed. Polymeric films were chosen since they are more resilient than self-assembled monolayers and they can be patterned in a straight forward manner by modifying standard lithographic techniques. The proposed approaches offer the advantages of photolithography based methods i.e. accuracy, reliability, adaptability to different substrates and easy integration in the fabrication of Microarrays, Bio-MicroElectroMechanical systems (BioMEMs), and generally in mass fabrication processes.

In the first part of the Thesis the development of a procedure for the patterning of biomolecules through chemical bonding on patterned films of an epoxy-based resist was achieved. The innovative aspect in this approach relies in the fact that the modification of the surface for the chemical binding of the biomolecule and the photolithography are performed by the same material leading to a single step not-time consuming procedure. In addition, the high resolution patterning capability of the used photoacid generator containing epoxy resist is employed. The sulfosuccinimidyl-6-biotin-amido hexanoate was found to react readily with the epoxy rings onto the patterned structures, while the binding of non-modified biotin is negligible on the patterned structures excluding the possibility of having physical adsorption of the biotin. Using deep UV exposure and contact printing, upon optimization of lithographic process conditions, arrays of sulfosuccinimidyl-6-biotin-amido hexanoate spots with diameter down to 0.5  $\mu\text{m}$  were created on which streptavidin was successfully immobilized.

In the second part of the PhD thesis a photolithographically patternable material that resists the protein adsorption and the adherence of cells was applied for biopatterning. The process is based on the patterning of poly(vinyl alcohol) (PVA) films by photochemically induced crosslinking. This photolithographic approach applied in the past for DUV Lithography was modified in order to be appropriate for bio-applications. The crosslinked PVA resists remarkably the adsorption of proteins even after 22 h incubation to protein solution. For achieving selective protein patterning through the PVA photolithographic process polystyrene (PS) was selected as the most suitable underlayer for protein adsorption. Following the proposed photolithographic procedure structures down to 2.5  $\mu\text{m}$  were created. The patterned surfaces were immersed into protein solutions and it was observed that proteins were immobilized only to the PS regions while they were not adsorbed on the PVA structures. Next, the selective adherence of cells on suitable substrates was also demonstrated by applying the photolithographic patterning of PVA. It was shown that cells adhere selectively on the regions that were revealed after the removal of the unexposed PVA film, while cells do not adhere on the PVA structures.

Key words: photolithography, microstructures, polymeric films, epoxy resin, poly(vinyl alcohol), proteins, biomolecules, cells





## ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής ήταν η διερεύνηση των δυνατοτήτων αξιοποίησης πολυμερικών φωτολιθογραφίσιμων υλικών στην επιλεκτική προσρόφηση βιομορίων και κυττάρων σε στερεές επιφάνειες. Ο έλεγχος της πρόσδεσης βιομορίων και κυττάρων είναι σημαντικός για την μικρο-κατασκευή συσκευών που χρησιμοποιούνται στα βιο-ηλεκτρονικά, στους βιοαισθητήρες, σε ιατρικές μελέτες, σε βιοαναλυτικές διατάξεις, στο σχεδιασμό φαρμάκων και σε παρεμφερείς εφαρμογές. Ειδικότερα στις βιοαναλυτικές διατάξεις είναι σημαντική η ακινητοποίηση των βιομορίων σε συγκεκριμένες θέσεις έτσι ώστε να είναι δυνατή η άμεση ανίχνευσή τους. Τα ακινητοποιημένα στις σχηματοποιημένες επιφάνειες βιομόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση συμπληρωματικών μορίων σε βιολογικά υγρά. Συνήθως ακινητοποιούνται αντιγόνα ή αντισώματα στη στερεή επιφάνεια και ανιχνεύονται αντισώματα ή αντιγόνα που βρίσκονται στο βιολογικό υγρό. Επιπλέον, η ελεγχόμενη προσκόλληση κυττάρων αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση βασικών κυτταρικών λειτουργιών καθώς είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον έλεγχο της μορφολογίας, της ανάπτυξης, της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Ειδικότερα η προσκόλληση νευρικών κυττάρων πάνω σε τέτοιες μικροδομές παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μια και τα συγκεκριμένα κύτταρα διακρίνονται από την ικανότητα τους να εκτείνουν κατευθυνόμενα νευρίτες όταν αναπτύσσονται σε σχηματοποιημένες επιφάνειες. Για να είναι επιτυχής η σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων σε επιφάνειες είναι απαραίτητος, συνήθως, ο συνδυασμός μεθόδων μικροκατασκευής με χημικές μεθόδους τροποποίησης της επιφάνειας, οι οποίες εξασφαλίζουν την ακινητοποίηση των βιομορίων και των κυττάρων.

Ο πρώτος στόχος της Διδακτορικής Διατριβής ήταν να πραγματοποιηθεί η ακινητοποίηση βιομορίων πάνω σε στερεή επιφάνεια μέσω χημικής πρόσδεσης. Η ακινητοποίηση των πρωτεϊνών μέσω χημικών δεσμών προτιμάται έναντι της φυσικής προσρόφησης γιατί στηρίζεται σε ισχυρούς δεσμούς ενώ αποτρέπεται σε μεγαλύτερο βαθμό η μετουσίωσή τους. Στην πρώτη ενότητα των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται η επίτευξη της ακινητοποίησης ενός μικρού βιομορίου, της βιοτίνης, η οποία ακινητοποιήθηκε μέσω χημικής πρόσδεσης σε επιφάνεια εποξειδικής ρητίνης.

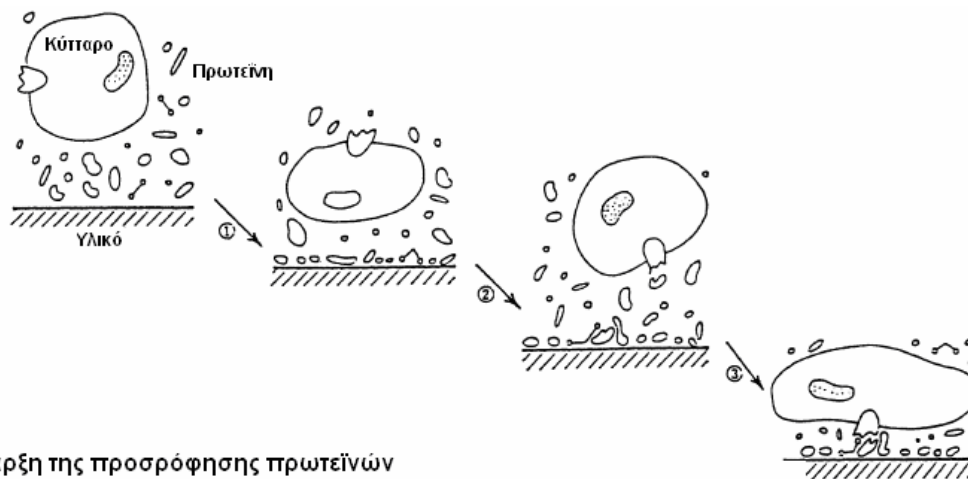
Ο δεύτερος στόχος της Διδακτορικής Διατριβής ήταν η εύρεση πολυμερικών υλικών που αποτρέπουν τη φυσική προσρόφηση πρωτεϊνών και την προσκόλληση κυττάρων με σκοπό τα υλικά αυτά να εφαρμοστούν στη σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων. Το θέμα της αποτροπής της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων είναι πολύ σημαντικό καθώς τα υλικά αυτά μπορούν να εφαρμοστούν σε εμφυτεύσιμα βιο-μικροηλεκτρομηχανικά συστήματα και είναι απαραίτητα υλικά για την κατασκευή μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών προκειμένου να μειωθεί ο θόρυβος από τις περιοχές στις οποίες δεν πρέπει να ακινητοποιούνται οι πρωτεΐνες. Η εύρεση πολυμερικού υλικού που αποτρέπει την προσρόφηση πρωτεϊνών και κυττάρων μελετήθηκε διεξοδικά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη δεύτερη και την τρίτη ενότητα. Συγκεκριμένα στη δεύτερη ενότητα των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται η επίτευξη της σχηματοποίησης πρωτεϊνών μέσω υλικού που αποτρέπει τη φυσική προσρόφηση, ενώ στην τρίτη ενότητα το ίδιο υλικό εφαρμόστηκε για τη σχηματοποίηση κυττάρων.



## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΤΕΡΕΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και κυττάρων με στερεές επιφάνειες είναι πολύ σημαντική για την ιατρική καθώς τα εμφυτεύσιμα υλικά είναι απαραίτητο να μην επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Μία σοβαρή επιπλοκή στα εμφυτεύσιμα βιοϋλικά είναι ο σχηματισμός θρόμβων, ο οποίος εκκινείται από την προσκόλληση πρωτεϊνών στις επιφάνειές τους [1, 2]. Γενικότερα, όταν μία επιφάνεια έρχεται σε επαφή με βιολογικό υλικό [3] αρχικά προσροφώνται οι πρωτεΐνες, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί εκρόφιση των προσροφημένων πρωτεϊνών και προσρόφιση άλλων πρωτεϊνών. Ορισμένες από τις προσροφημένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς που βρίσκονται στη μεμβράνη των κυττάρων με αποτέλεσμα την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια (Σχήμα 1).



1. Έναρξη της προσρόφησης πρωτεϊνών

2. Ανταλλαγή προσροφημένων πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο διάλυμα

3. Προσκόλληση κυττάρου μέσω αλληλεπίδρασης των υποδοχέων που υπάρχουν στη μεμβράνη με τις προσροφημένες πρωτεΐνες

**Σχήμα 1.** Προσκόλληση κυττάρου σε επιφάνεια μέσω προσροφημένων πρωτεϊνών [3].

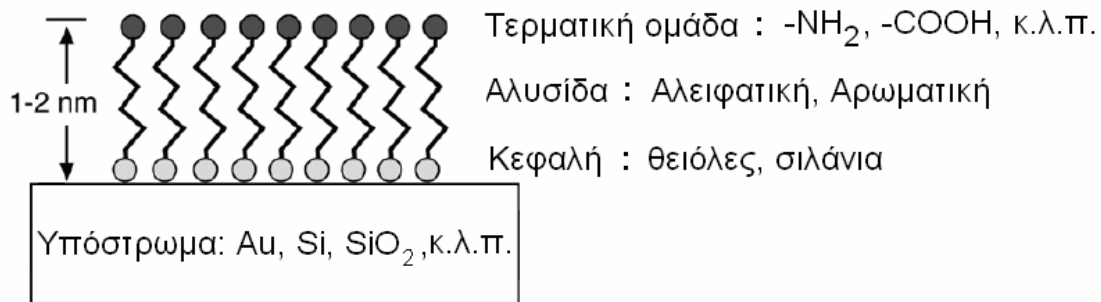
Εκτός από την ιατρική, η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των βιομορίων και των κυττάρων με στερεές επιφάνειες είναι σημαντική για την ενζυμική βιοτεχνολογία [4], τις συσκευασίες τροφίμων [5, 6], τις καλλιέργειες κυττάρων [7] κ.ά. Συνολικά, στις εφαρμογές που προαναφέρθηκαν απαιτείται είτε η ενίσχυση της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων, για παράδειγμα στις καλλιέργειες κυττάρων, είτε η αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων, για παράδειγμα σε εμφυτεύσιμα βιοϋλικά.

Η τροποποίηση των στερεών επιφανειών προκειμένου να επιτευχθεί ή να αποτραπεί η ακινητοποίηση των πρωτεϊνών και των κυττάρων γίνεται με Αυτοοργανωμένα Μονομοριακά Στρώματα, ΑΜΣ (Self-Assembly Monolayers, SAMs) [8, 9, 10] ή με πολυμερικά υλικά [11, 12, 13].

## 1.1. Υλικά τροποποίησης στερεών επιφανειών

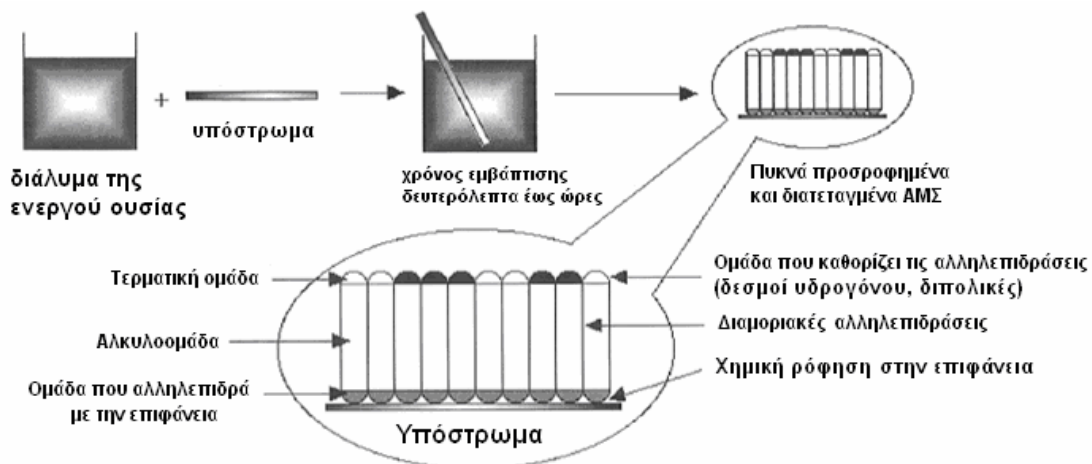
### 1.1.1. Αυτοοργανωμένα Μονομοριακά Στρώματα (ΑΜΣ)

Τα Αυτοοργανωμένα Μονομοριακά Στρώματα, ΑΜΣ (Self-Assembly Monolayers, SAMs) δημιουργούνται από μόρια που περιέχουν μία ομάδα που αντιδρά με το υπόστρωμα, συνήθως οι ομάδες αυτές είναι σιλάνια ή θειόλες, μια αλκυλο-αλυσίδα και μία τερματική ομάδα (Σχήμα 2). Επομένως, υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες Αυτοοργανωμένων Μονομοριακών Στρωμάτων: τα ΑΜΣ σιλανίων και τα ΑΜΣ θειολών. Τα ΑΜΣ σιλανίων εισήχθησαν από τον Sagiv [14] και τα ΑΜΣ θειολών χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τους Nuzzo και Allara [15].



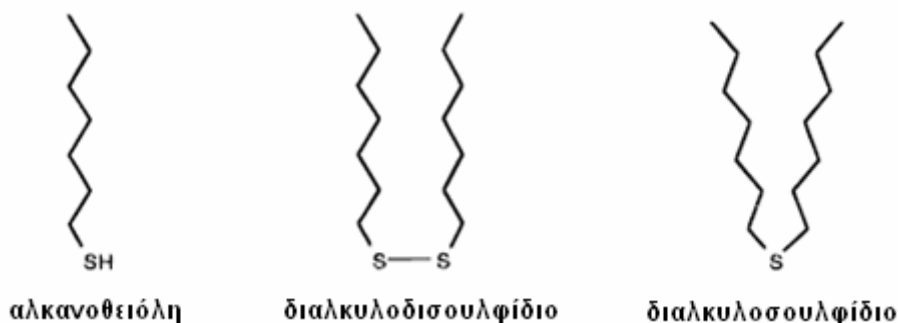
**Σχήμα 2.** Δομή των Αυτοοργανωμένων Μονομοριακών Στρωμάτων. Αποτελούνται από μία ομάδα που αντιδρά με το υπόστρωμα, μία αλυσίδα και μία τερματική ομάδα [16].

Τα μόρια που δημιουργούν τα ΑΜΣ είναι ενεργά τασιενεργά και προσροφώνται σε ένα στερεό υπόστρωμα ως ακολούθως: Αρχικά το υπόστρωμα βυθίζεται στο διάλυμα της ενεργού ουσίας, όπου αλληλεπιδρά με την εμβαπτισμένη επιφάνεια, και στη συνέχεια η ενεργός ουσία προσροφάται στην επιφάνεια μέχρι τη στιγμή που επέρχεται ισορροπία στο σύστημα (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3.** Τα ΑΜΣ σχηματίζονται με εμβάπτιση του υποστρώματος στο διάλυμα της ενεργού ουσίας. Αρχικά σχηματίζονται χημικοί δεσμοί μεταξύ της ουσίας και της επιφάνειας και στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μέχρι να επέλθει ισορροπία στο σύστημα [17].

Τα ΑΜΣ θειολών (Σχήμα 4) προσδένονται σε χρυσό, άργυρο, χαλκό, πλατίνα, υδράργυρο, σίδηρο, GaAs και InP [17].

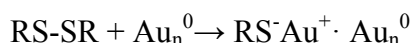


**Σχήμα 4.** Ορισμένα Αυτοοργανωμένα Μονομοριακά Στρώματα θειολών [17].

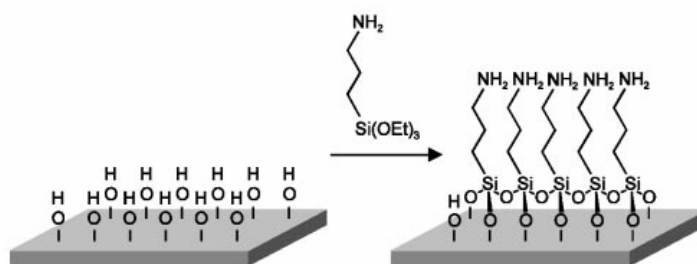
Κυρίως, έχει μελετηθεί η ακινητοποίηση σε υπόστρωμα χρυσού, η οποία συμβαίνει σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο προσροφάται η ουσία στην επιφάνεια και στο δεύτερο οι αλκυλο-αλυσίδες αναδιοργανώνονται. Οι θειόλες αντιδρούν με την επιφάνεια χρυσού σύμφωνα με την αντίδραση [17]:



και τα δισουλφίδια αντιδρούν σύμφωνα με την αντίδραση:



Τα ΑΜΣ σιλανίων (αλκυλο-χλωροσιλανίων, αλκυλο-αλκοξυσιλανίων και αλκυλο-αμινοσιλανίων) προσδένονται σε υδροξυλιωμένες επιφάνειες, με τις οποίες δημιουργούνται δεσμοί Si-O-Si, δηλαδή σχηματίζονται σιλοξάνια [17]. Ένα παράδειγμα είναι η πρόσδεση του 3-αμινοπροπυλο-τριαιθοξυσιλανίου (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES) σε επιφάνεια πυριτίου που περιέχει υδροξυλομάδες (Σχήμα 5).



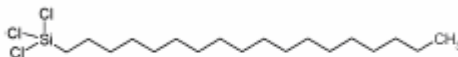
**Σχήμα 5.** Αντίδραση του 3-αμινοπροπυλο-τριαιθοξυσιλανίου (APTES) με τις υδροξυλομάδες της επιφάνειας [18].

Επίσης, τα ΑΜΣ σιλανίων μπορούν να προσροφηθούν σε οξείδιο του πυριτίου, οξείδιο του αλουμινίου, οξείδιο του γερμανίου, χαλαζία, μίκα και χρυσό [17].

Οι Moon et al. [19, 20] μελέτησαν το σχηματισμό ΑΜΣ από το 3-αμινοπροπυλο-τριαιθοξυσιλάνιο και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το 3-αμινοπροπυλο-τριαιθοξυσιλάνιο σχηματίζει ένα στρώμα ανομοιογενές, το οποίο γίνεται πολυστρωματικό για μεγάλους χρόνους εμβάπτισης.

Επίσης, για να παραχθούν υψηλής ποιότητας ΑΜΣ χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα του νερού που υπάρχει στο διάλυμα. Αν δεν υπάρχει αρκετό νερό τότε δημιουργούνται ημιτελή ΑΜΣ, ενώ αν υπάρχει περίσσεια νερού

διευκολύνεται ο πολυμερισμός στο διάλυμα με αποτέλεσμα την εναπόθεση πολυσιλοξάνης στην επιφάνεια [17].



**n-οκταδεκυλοτριχλωροσιλάνιο**

**Σχήμα 6.** Δομή του n-οκταδεκυλοτριχλωροσιλανίου (n-octadecyltrichlorosilane, OTS) [21].

Ένα παράδειγμα που αναδεικνύει πόσο σημαντική είναι η παράμετρος της υγρασίας φαίνεται μέσα από το σχηματισμό ΑΜΣ n-οκταδεκυλοτριχλωροσιλανίου (OTS) (Σχήμα 6) σε υπόστρωμα γυαλιού. Αρχικά, εξάγεται η υγρασία από την επιφάνεια, στη συνέχεια υδρολύεται το OTS στην υγρή φάση και τέλος το σιλάνιο αντιδρά με το γυαλί. Η βέλτιστη τιμή υγρασίας για το σχηματισμό πυκνού ΑΜΣ OTS που καλύπτει το υπόστρωμα είναι 0.15 mg ανά 100 mL διαλύτη [22].

Μία άλλη παράμετρος που επηρεάζει πολύ το σχηματισμό του μονομοριακού στρώματος είναι η θερμοκρασία. Σε χαμηλές θερμοκρασίες οι υδρολυμένες τριχλωροσιλο-ομάδες προτιμούν να αντιδράσουν με Si-OH της επιφάνειας παρά να αντιδράσουν μεταξύ τους προς σχηματισμό πολυμερούς στο διάλυμα. Για παράδειγμα το OTS σχηματίζει πολύ καλό Αυτοοργανωμένο Μονομοριακό Στρώμα στους 18 °C για 2 min εμβάπτισης του υποστρώματος, ενώ για 24 h εμβάπτισης στους 30 °C δεν σχηματίζεται καλό ΑΜΣ [23]. Επίσης, με τη μείωση της θερμοκρασίας μειώνονται οι αταξίες στο σχηματισμένο μονομοριακό στρώμα λόγω μειωμένης κινητικότητας, καθώς οι ακινητοποιημένες αλυσίδες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δυνάμεις Van der Waals [24]. Επομένως, ο προσεκτικός έλεγχος των συνθηκών (χρόνος εμβάπτισης, περιεκτικότητα του διαλύματος σε νερό, θερμοκρασία) είναι απαραίτητος για το σχηματισμό ΑΜΣ.

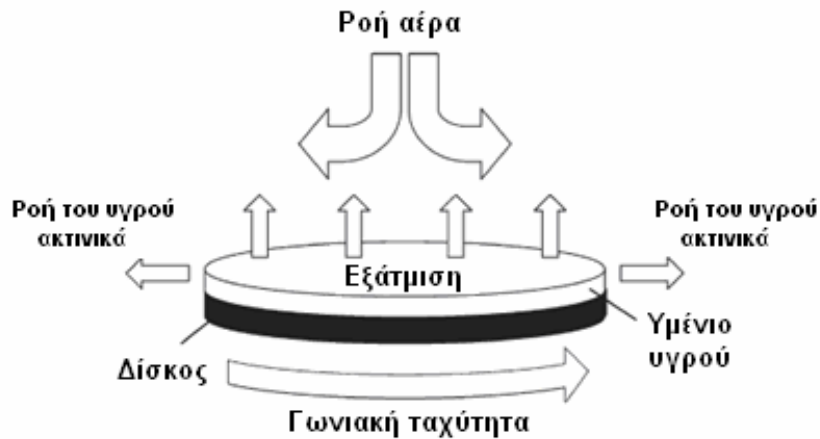
### 1.1.2. Πολυμερικά υμένια

Πολυμερικά υμένια πάνω σε στερεές επιφάνειες δημιουργούνται με διάφορες μεθόδους. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

1. Επίστρωση μέσω περιστροφής (spin coating)
2. Χημική πρόσδεση πολυμερικών αλυσίδων (grafting)
3. Σχηματισμός υμενίου με εμβάπτιση (dip coating)

#### 1.1.2.1. Επίστρωση μέσω περιστροφής

Η επίστρωση μέσω περιστροφής (Σχήμα 7) χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή πολυμερικών υμενίων ομοιόμορφων όσον αφορά το πάχος και τη σύσταση. Η διαδικασία περιλαμβάνει την εναπόθεση ενός διαλύματος πολυμερούς σε έναν ακίνητο δίσκο, ο οποίος στη συνέχεια περιστρέφεται με σταθερή γωνιακή ταχύτητα. Οι δυνάμεις συνοχής του διαλύματος με το υπόστρωμα και οι φυγόκεντρες δυνάμεις που αναπτύσσονται, λόγω της περιστροφής, έχουν ως αποτέλεσμα την εξάτμιση του διαλύτη, έτσι ώστε τελικά να δημιουργείται ένα στερεό ομοιόμορφο πολυμερικό υμένιο.



Σχήμα 7. Επίστρωση μέσω περιστροφής [25].

Η γωνιακή ταχύτητα του δίσκου επηρεάζει το πάχος του υμενίου που τελικά σχηματίζεται με βάση τη σχέση:

$$h = k_1 \omega^\alpha \quad (1)$$

Όπου  $h$ , το τελικό πάχος του υμενίου  
 $\omega$ , η γωνιακή ταχύτητα

$k_1$  και  $\alpha$ , εμπειρικές σταθερές που εξαρτώνται από τις φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς, του διαλύτη και του υποστρώματος, τις αλληλεπιδράσεις του πολυμερούς με το διαλύτη και του διαλύματος με το υπόστρωμα και τις ρεολογικές ιδιότητες. Το  $\alpha$  αλλάζει ελάχιστα για διαφορετικά συστήματα πολυμερούς/διαλύτη και στις περισσότερες μελέτες τίθεται ίσο με  $-0.5$  [25].

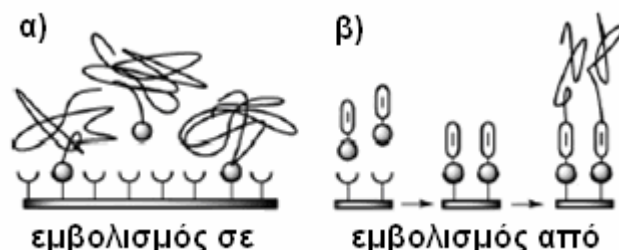
Η πητικότητα του διαλύτη και οι αλληλεπιδράσεις του πολυμερούς με το διαλύτη επηρεάζουν την ποιότητα του υμενίου που σχηματίζεται. Υψηλής ποιότητας υμένια παρασκευάζονται όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες χαμηλής πητικότητας γιατί το ιξώδες δεν μεταβάλλεται απότομα κατά τη διαδικασία της περιστροφής. Όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες υψηλής πητικότητας τότε αυξάνεται απότομα το ιξώδες και εμποδίζεται η ροή του υγρού πάνω στην επιφάνεια. Επίσης, όταν υπερισχύουν (ευνοούνται) οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων έναντι των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του διαλύτη και των πολυμερικών αλυσίδων τότε δημιουργείται ένα εμπόδιο στην εξάπλωση του υμενίου κατά τη διαδικασία της περιστροφής με αποτέλεσμα να παρασκευάζονται υμένια κακής ποιότητας [26].

Η ποιότητα των σχηματιζόμενων υμενίων εξαρτάται και από τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό συσσωματωμάτων (aggregation). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι αμελητέες στα διαλύματα του πολυμερούς καθώς στο διάλυμα οι πολυμερικές αλυσίδες είναι απομονωμένες μεταξύ τους, ενώ αύξηση της συγκέντρωσης προκαλεί το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Το ιξώδες του διαλύματος μέχρι έναν βαθμό αντικατοπτρίζει τις ενδομοριακές δυνάμεις. Η μορφολογία των επιστρωμένων υμενίων εξαρτάται από τη γωνιακή ταχύτητα όταν η φυγόκεντρος δύναμη είναι συγκρίσιμη με τις δυνάμεις συνάφειας που έχουν αναπτυχθεί μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων στο διάλυμα [25].

### 1.1.2.2. Χημική πρόσδεση πολυμερικών αλυσίδων

Οι πολυμερικές αλυσίδες μπορούν να προσροφηθούν χημικά στα υποστρώματα ή να αρχίσουν να σχηματίζονται σε αυτά και στις περιπτώσεις αυτές αναφέρονται ως πολυμερικές ψήκτρες (polymer brushes). Στην πρώτη μέθοδο, η οποία είναι γνωστή

ως τεχνική «εμβολισμού σε» (grafting to), οι πολυμερικές αλυσίδες φέρουν μία ενεργή ομάδα που αντιδρά με τις ενεργές θέσεις του υποστρώματος (Σχήμα 8α). Στη δεύτερη μέθοδο, η οποία είναι γνωστή ως τεχνική «εμβολισμού από» (grafting from), ο εκκινητής για το σχηματισμό του πολυμερούς ή το μονομέρες του πολυμερούς έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια (Σχήμα 8β).



**Σχήμα 8.** Μέθοδοι πρόσδεσης πολυμερικών αλυσίδων σε στερεά υποστρώματα: α) με την τεχνική «εμβολισμού σε» (grafting to), β) με την τεχνική «εμβολισμού από» (grafting from) [27].

Εφαρμόζοντας την πρώτη μέθοδο συχνά δεν αξιοποιούνται όλες οι ενεργές θέσεις της επιφάνειας γιατί πολλές ενεργές θέσεις μπλοκάρονται από τις ήδη ακινητοποιημένες πολυμερικές αλυσίδες, ενώ εφαρμόζοντας τη δεύτερη μέθοδο αξιοποιούνται περισσότερες ενεργές ομάδες της επιφάνειας [27].

Η δεύτερη μέθοδος ονομάζεται μέθοδος πολυμερισμού από την επιφάνεια (surface-initiated polymerization, SIP) [28]. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να εκκινήσει από την επιφάνεια οποιουδήποτε είδους πολυμερισμός, όπως πολυμερισμός με μηχανισμό διάνοιξης του δακτυλίου (Ring-opening Polymerization, ROP) [29-32], πολυμερισμός με μηχανισμό μετάθεσης της διάνοιξης του δακτυλίου (Ring-opening Metathesis Polymerization, ROMP) [33-36], πολυμερισμός με μηχανισμό ελευθέρων ριζών (Free radical Polymerization), οι οποίες σχηματίζονται μέσω φωτοχημικών (Photo induced Polymerization) [37] ή θερμικών αντιδράσεων (Thermal initiated Polymerization) [38], ανιοντικός [39] και κατιοντικός πολυμερισμός [39, 40], πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης-σχάσης αλυσίδας (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT) [41], πολυμερισμός με τη διαμεσολάβηση νιτροξειδίου (Nitroxide Mediated Polymerization, NMP) [42] και πολυμερισμός μεταφοράς ατόμου με μηχανισμό ελευθέρων ριζών (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP) [43-48].

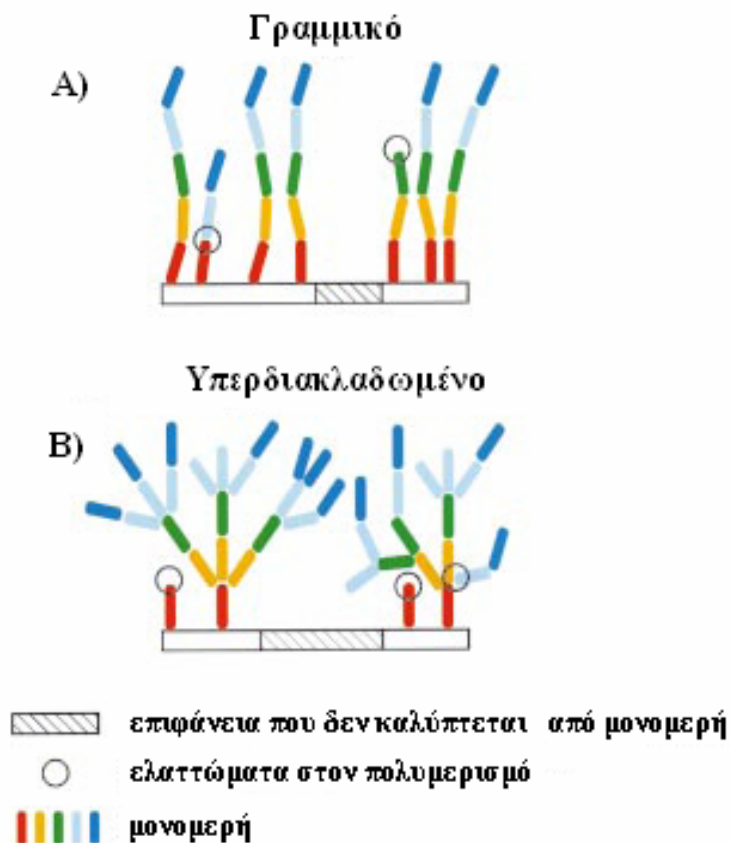
#### 1.1.2.2.1. Πρόσδεση υπερδιακλαδωμένων πολυμερικών υμενίων

Μία υποκατηγορία της μεθόδου πρόσδεσης πολυμερικών αλυσίδων είναι η πρόσδεση υπερδιακλαδωμένων πολυμερικών υμενίων (hyperbranched polymer films). Τα υπερδιακλαδωμένα πολυμερή μπορούν να προσδεθούν σε ανόργανα και οργανικά υποστρώματα χωρίς να είναι απαραίτητη η πρόσδεσή τους σε πολλά σημεία του υποστρώματος, γιατί καλύπτουν επαρκώς την επιφάνεια λόγω των διακλαδώσεών τους. Επίσης, καλύπτουν ατέλειες της επιφάνειας και τα τελικά υμένια δεν επηρεάζονται από προβλήματα στη σύνθεση του πολυμερούς, που ορισμένες φορές εμφανίζονται σε μεμονωμένα σημεία (Σχήμα 9).

Τα υπερδιακλαδωμένα πολυμερή διαθέτουν μεγάλο αριθμό λειτουργικών ομάδων, έχουν ακανόνιστη δομή και είναι ανθεκτικά. Το πάχος των τελικών υμενίων μπορεί να καθοριστεί από τα στάδια της σύνθεσης και μπορεί να κυμανθεί από μερικά έως χιλιάδες νανόμετρα [49, 50]. Η διαμόρφωση του πολυμερούς και η τελική μορφή του υμενίου εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας που διακλαδώνεται και από την πυκνότητα των δεσμών που σχηματίζονται με την επιφάνεια [51]. Για παράδειγμα

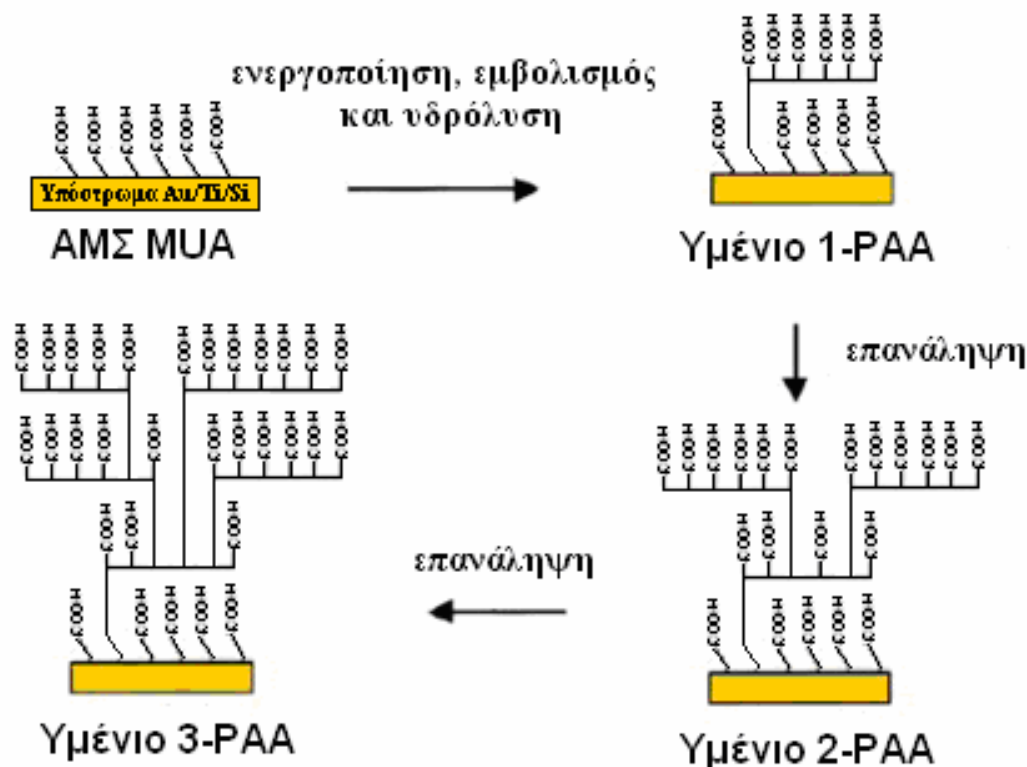


ένα υπερδιακλαδωμένο υμένιο πολυστυρενίου με μεγάλη πυκνότητα δεσμών με την επιφάνεια παρουσιάζει σφαιρική διαμόρφωση στο τελικό υμένιο, ενώ όταν η πυκνότητα δεσμών με την επιφάνεια είναι μικρή τότε η τελική διαμόρφωση επηρεάζεται από δυνάμεις προσρόφησης και είναι σχεδόν πεπλατυσμένες σφαίρες [52].



**Σχήμα 9.** Σύγκριση των γραμμικών πολυμερικών αλυσίδων (A) με τα υπερδιακλαδωμένα πολυμερή (B). Παρατηρείται ότι τα υπερδιακλαδωμένα πολυμερή καλύπτουν ατέλειες της επιφάνειας και παρακάμπτουν ατέλειες στη σύνθεση του πολυμερούς [49].

Η σύνθεση ενός υπερδιακλαδωμένου πολυμερικού υμενίου πολυ(ακρυλικού οξέος) [49] σε ένα ανόργανο υπόστρωμα μπορεί να ξεκινήσει μέσω της αντίδρασης με ένα μόριο που διαθέτει δύο λειτουργικές ομάδες και το οποίο έχει ακινητοποιηθεί στο υπόστρωμα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένα ΑΜΣ μερκαπτοδεκανοϊκού οξέος (mercaptoundecanoic acid, MUA) το οποίο προσδένεται σε χρυσό. Σε ένα ανόργανο υπόστρωμα η σύνθεση είναι ακόμα πιο εύκολη: για παράδειγμα μετά από την οξείδωση του πολυ(αιθυλενίου) παράγονται αρκετές ομάδες στις οποίες μπορούν να προσδεθούν οι πολυμερικές αλυσίδες. Η ενεργοποίηση των ακινητοποιημένων στην επιφάνεια καρβοξυλομάδων γίνεται μέσω ενός μικτού ανυδρίτη και ακολουθεί η αντίδραση με τον α,ω-διαμινο-πολυ(ακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα) (α,ω-diamino-poly(tert-butylacrylate)), με αποτέλεσμα αυτός να προσδένεται στην επιφάνεια. Στη συνέχεια ακολουθεί υδρόλυση του με καταλύτη το p-τολουενοσουλφονικό οξύ (p-Toluenesulfonic acid, p-TsOH) στους 50 - 55 °C για 1 h, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του πρώτου στρώματος πολυ(ακρυλικού οξέος) (1-PAA). Επανάληψη αυτών των σταδίων οδηγεί στη δημιουργία ενός υπερδιακλαδωμένου υμενίου πολυ(ακρυλικού οξέος) (υμένιο 2-PAA και υμένιο 3-PAA) (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Ανάπτυξη υπερδιακλαδωμένου υμενίου πολυ(ακρυλικού οξέος) [49].

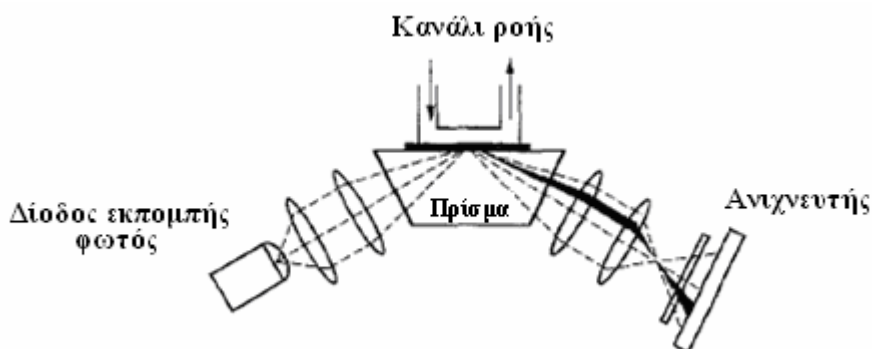
### 1.1.2.3. Σχηματισμός υμενίου με εμβάπτιση

Με τη διεργασία της εμβάπτισης (dip-coating) όταν το υπόστρωμα είναι επίπεδο σχηματίζεται ομοιογενές υμένιο, ενώ όταν το υπόστρωμα δεν είναι επίπεδο σχηματίζεται ένα ανομοιογενές υμένιο. Στη διεργασία σχηματισμού υμενίου με εμβάπτιση το υπόστρωμα εμβαπτίζεται στο πολυμερικό διάλυμα σε κάθετη θέση [53]. Το πάχος του υμενίου που σχηματίζεται εξαρτάται από την ταχύτητα απομάκρυνσης του υποστρώματος (withdrawal velocity), τη συγκέντρωση και το ιξώδες του πολυμερικού διαλύματος [25].

## 1.2. Μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνών που έχουν προσροφηθεί σε στερεές επιφάνειες

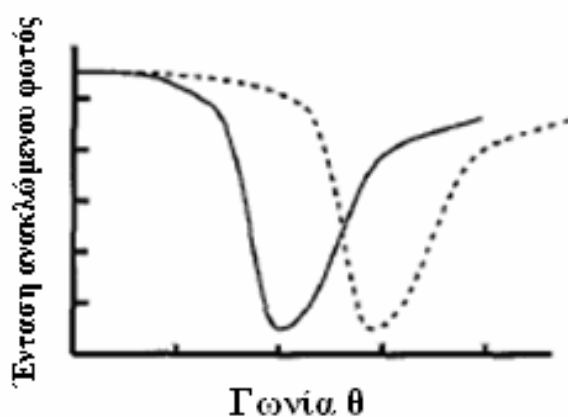
Οι κύριες μέθοδοι για την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν προσροφηθεί σε στερεές επιφάνειες είναι η μέθοδος του συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) και η επισήμανση των πρωτεϊνών με φθορίζουσες ουσίες.

Ο συντονισμός των επιφανειακών πλασμονίων είναι μία μέθοδος που εφαρμόζεται ευρέως για τη μελέτη της κινητικής της προσρόφησης πρωτεϊνών σε στερεές επιφάνειες. Η μέθοδος SPR στηρίζεται στη διέγερση των επιφανειακών πλασμονίων μιας μεταλλικής επιφάνειας, συνήθως χρυσού. Η SPR είναι κατάλληλη μέθοδος για μελέτες αλληλεπιδράσεων μακρομορίων σε διεπιφάνειες υγρού-στερεού. Το σύστημα ανίχνευσης περιλαμβάνει μία μονοχρωματική πολωμένη πηγή φωτός, ένα πρίσμα γυαλιού, ένα λεπτό μεταλλικό υμένιο σε επαφή με τη βάση του πρίσματος και ένα φωτοανιχνευτή (Σχήμα 11) [54].



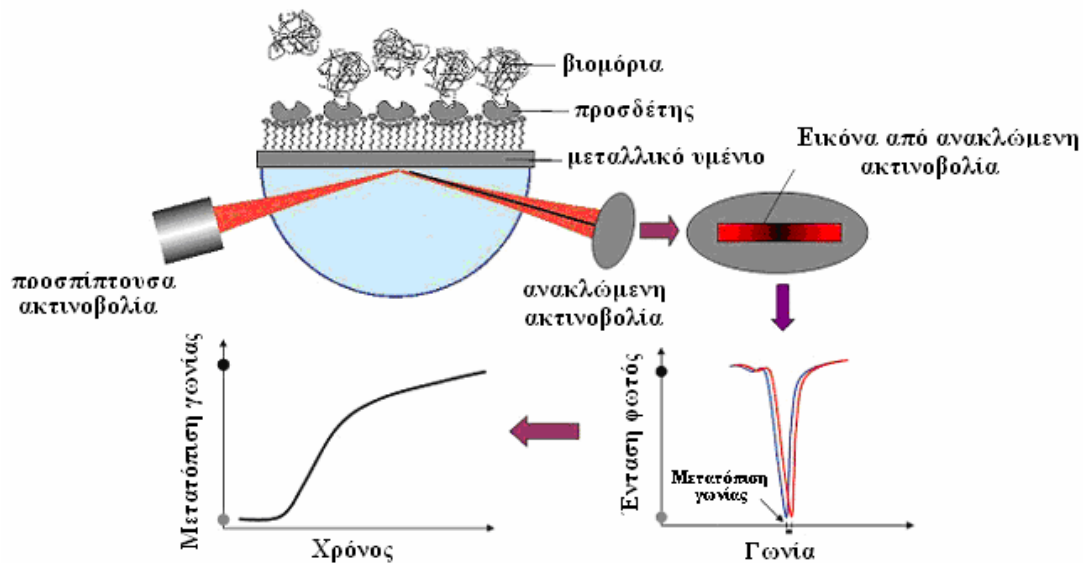
**Σχήμα 11.** Απεικόνιση μιας διάταξης συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων (SPR) που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της προσρόφησης πρωτεϊνών [54].

Η προσπίπτουσα δέσμη φωτός στη βάση του πρίσματος θα υποστεί ολική ανάκλαση για γωνίες μεγαλύτερες από την κρίσιμη γωνία. Σε μία συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης  $\theta$  στη γωνία SPR, επιτυγχάνεται διέγερση των επιφανειακών πλασμονίων στη διεπιφάνεια μετάλλου-υγρού, δηλαδή επιτυγχάνεται συντονισμός. Όταν επιτυγχάνεται συντονισμός τότε τα επιφανειακά πλασμόνια διεγείρονται απορροφώντας ενέργεια με αποτέλεσμα να μειώνεται η ένταση του ανακλώμενου φωτός. Η γωνία SPR εξαρτάται από τις οπτικές ιδιότητες του πρίσματος, του μετάλλου, του μέσου που είναι σε επαφή με το μέταλλο, του πάχους του μετάλλου και από το μήκος κύματος της πηγής φωτός. Η γωνία SPR είναι ευαίσθητη σε μεταβολές του δείκτη διάθλασης της επιφάνειας του μετάλλου που έρχεται σε επαφή με το υγρό. Όταν προσροφάται ένα στρώμα πρωτεΐνης πάνω στην μεταλλική επιφάνεια και δεν μεταβάλλεται τίποτα άλλο, τότε η γωνία SPR μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες τιμές (Σχήμα 12) [54].



**Σχήμα 12.** Γραφική απεικόνιση της έντασης του ανακλώμενου φωτός συναρτήσει της γωνίας πρόσπτωσης  $\theta$ : για την μεταλλική επιφάνεια του αισθητήρα SPR (-), για την μεταλλική επιφάνεια στην οποία έχει προσροφηθεί πρωτεΐνη (---) [54].

Καταγράφοντας αυτή τη μεταβολή  $\Delta\theta$  σε σχέση με το χρόνο (απόκριση του αισθητήρα SPR), δηλαδή τη μεταβολή στη γωνία στην οποία επιτυγχάνεται συντονισμός σε σχέση με το χρόνο εξάγονται συμπεράσματα για την προσρόφηση πρωτεϊνών σε διάφορες επιφάνειες, καθώς η μεταλλική επιφάνεια μπορεί να τροποποιηθεί με διαφορετικά υλικά (Σχήμα 13).



**Σχήμα 13.** Τροποποίηση της μεταλλικής επιφάνειας με ΑΜΣ για την ακινητοποίηση βιομορίων. Καταγράφοντας τη μεταβολή στη γωνία πρόσπτωσης  $\theta$ , όπου επιτυγχάνεται ο συντονισμός στο αρχικό υμένιο και στο υμένιο μετά την προσρόφηση του βιομορίου, εξάγονται συμπεράσματα για την ακινητοποίηση των βιομορίων στο ΑΜΣ. Όταν επιτυγχάνεται συντονισμός στο ανακλώμενο φως εμφανίζεται μια μαύρη ζώνη [55].

Ως παράδειγμα χρήσης της μεθόδου SPR αποτελούν μελέτες του Whitesides και των συνεργατών του που αναφέρονται στη μελέτη ΑΜΣ, τα οποία ενισχύουν ή αποτρέπουν τη φυσική προσρόφηση πρωτεϊνών, με σκοπό να εξαγάγουν συμπεράσματα για τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει μία επιφάνεια για να ανθίσταται στην προσρόφηση πρωτεϊνών [56-59] ή για να μελετήσουν τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με υδρόφοβες επιφάνειες [60]. Στη μεταλλική επιφάνεια του SPR ακινητοποιούν διάφορα ΑΜΣ, τα οποία είτε αποτρέπουν είτε διευκολύνουν την προσρόφηση των πρωτεϊνών.

Αρχικά τροποποιούν την επιφάνεια του χρυσού με το ΑΜΣ που μελετούν. Στη συνέχεια περνούν από το κανάλι ροής διάφορα διαλύματα. Αρχικά περνούν ένα ρυθμιστικό διάλυμα, μετά ένα διάλυμα πρωτεΐνης διαλυμένης στο ρυθμιστικό διάλυμα και τέλος ξαναπερνούν ρυθμιστικό διάλυμα για να ξεπλύνουν την επιφάνεια.

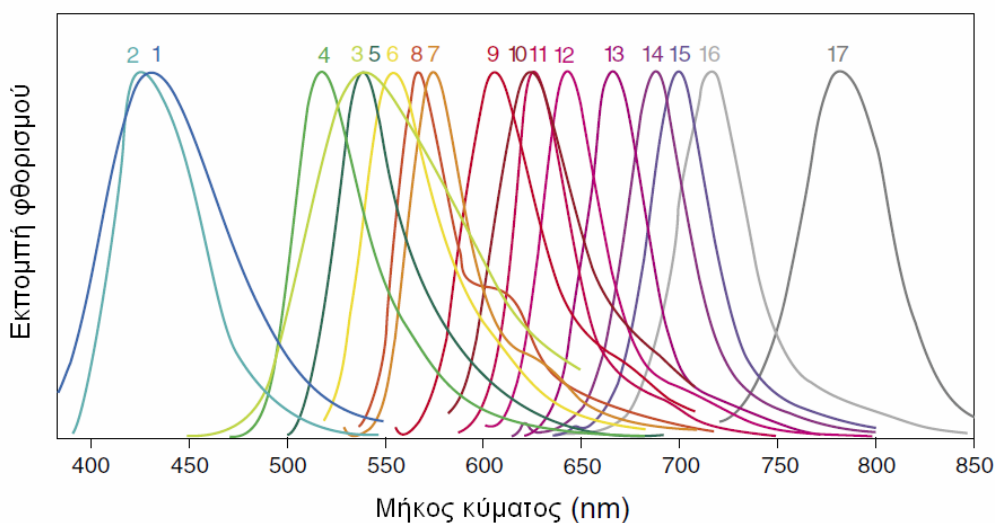
Με το σύστημα SPR έχουν μελετηθεί πολλά ΑΜΣ από την ομάδα του Whitesides. Συγκρίνοντας τα διαφορετικά ΑΜΣ εξάγουν συμπεράσματα για την προσρόφηση των πρωτεϊνών σε επιφάνειες. Ουσιαστικά, μέσω του συστήματος SPR παρατηρούν την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στην προς μελέτη επιφάνεια. Η επιφάνεια διαβρέχεται με το διάλυμα της πρωτεΐνης προκειμένου να μελετηθεί η ακινητοποίησή της. Στη συνέχεια όταν η επιφάνεια διαβρέχεται με το ρυθμιστικό διάλυμα ή με τασιενεργό διάλυμα τότε αναγεννάται.

Με τη μέθοδο SPR έχει αποδειχθεί η αντίσταση στη φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών πολλών επιφανειών, όπως της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) [61] και εσωτερικά φορτισμένων πολυμερών (zwitterionic polymers) [62, 63].

Μία άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των πρωτεϊνών είναι η επισήμανση των πρωτεϊνών με φθορίζουσες ουσίες. Ευρέως χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες ουσίες είναι οι Alexa Fluor. Στον Πίνακα 1 παρατίθενται τα μήκη κύματος της μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής και ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης και στο Σχήμα 14 δίνονται τα φάσματα εκπομπής για τις Alexa Fluor φθορίζουσες ουσίες.

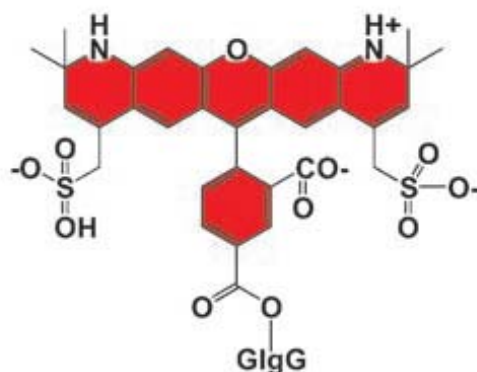
**Πίνακας 1.** Χαρακτηριστικά των φθορίζουσών ουσιών Alexa Fluor: χρώμα φθορίζουσας ουσίας, μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (nm), μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής (nm) και μοριακός συντελεστής απόσβεσης [64].

Χρώμα	Φθορίζουσα ουσία	Απορρόφηση	Εκπομπή	Μοριακός συντελεστής απόσβεσης
1	Alexa Fluor 350	346	442	19,000
2	Alexa Fluor 405	401	421	34,000
3	Alexa Fluor 430	433	541	16,000
4	Alexa Fluor 488	495	519	71,000
5	Alexa Fluor 514	517	542	80,000
6	Alexa Fluor 532	532	553	81,000
7	Alexa Fluor 546	556	573	104,000
8	Alexa Fluor 555	555	565	150,000
9	Alexa Fluor 568	578	603	91,300
10	Alexa Fluor 594	590	617	73,000
11	Alexa Fluor 610	612	628	138,000
12	Alexa Fluor 633	632	647	100,000
13	Alexa Fluor 647	650	665	239,000
14	Alexa Fluor 660	663	690	132,000
15	Alexa Fluor 680	679	702	184,000
16	Alexa Fluor 700	702	723	192,000
17	Alexa Fluor 750	749	775	240,000



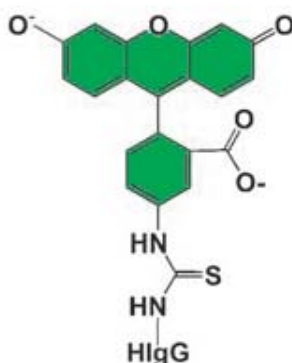
**Σχήμα 14.** Φάσματα εκπομπής των φθορίζουσών ουσιών Alexa Fluor που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 1 [64].

Οι φθορίζουσες ουσίες Alexa Fluor διαλύονται στο νερό και είναι σταθερές σε μεγάλο εύρος pH και μπορούν να προσδεθούν στις πρωτεΐνες. Μία συνήθης τεχνική είναι η τροποποίηση της φθορίζουσας ουσίας Alexa Fluor, έτσι ώστε να αντιδρά με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να ακινητοποιείται στις πρωτεΐνες [64]. Στο Σχήμα 15 φαίνεται η επισήμανση με Alexa Fluor 568 του αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού (goat anti rabbit IgG).



**Σχήμα 15.** Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού (goat anti-rabbit IgG) επισημασμένο με Alexa Fluor 568 [65].

Μία άλλη ευρέως χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα ουσία είναι το ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης (fluorescein isothiocyanate, FITC). Το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης είναι στα 495 nm και το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής είναι στα 521 nm. Το ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης μπορεί να αντιδράσει με τις αμινομάδες και τις θειομάδες που υπάρχουν στα αμινοξέα των πρωτεϊνών [66]. Στο Σχήμα 16 φαίνεται η επισήμανση με ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης της ανοσοσφαιρίνης G που προέρχεται από ανθρώπινο ορό (HIgG).



**Σχήμα 16.** Ανοσοσφαιρίνη G από ανθρώπινο ορό επισημασμένη με ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης (fluorescein isothiocyanate, FITC) [65].

### 1.3. Ακινητοποίηση πρωτεϊνών στις τροποποιημένες στερεές επιφάνειες

Η πρόσδεση βιομορίων πάνω σε στερεές επιφάνειες γίνεται μέσω:

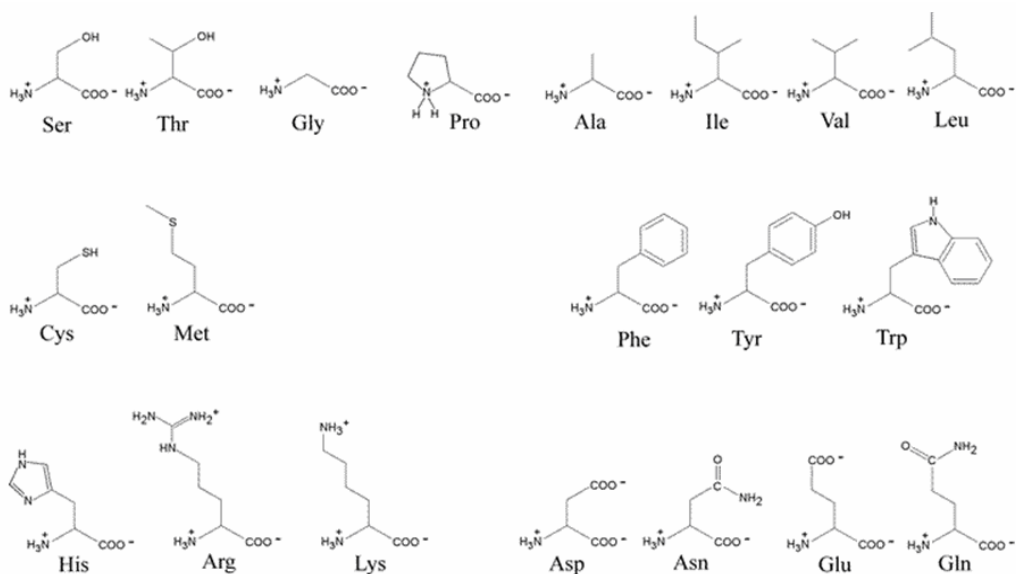
1. Χημικής ρόφησης
2. Φυσικής προσρόφησης

Η βασική διαφορά των προαναφερθέντων τρόπων πρόσδεσης έγκειται στο είδος των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των βιομορίων και της επιφάνειας. Η χημική ρόφηση αναπτύσσεται μέσω ομοιοπολικών δυνάμεων ενώ η φυσική προσρόφηση των βιομορίων εξασφαλίζεται μέσω διαμοριακών δυνάμεων. Επίσης ορισμένες φορές είναι απαραίτητη η τροποποίηση της επιφάνειας έτσι ώστε να αποτρέπεται η πρόσδεση βιομορίων σ' αυτήν.

Τα αμινοξέα μπορούν να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ή να έχουν καθαρό φορτίο μηδέν. Το pH στο οποίο το αμινοξύ έχει καθαρό φορτίο μηδέν ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο [67]. Για την καλύτερη παρακολούθηση της συζήτησης για την πρόσδεση των πρωτεϊνών στον Πίνακα 2 δίνεται η ονομασία των είκοσι συνηθέστερων αμινοξέων των πρωτεϊνών και η διεθνής σύντμησή τους με τρία γράμματα και ένα γράμμα, ενώ στο Σχήμα 17 δίνεται η δομή τους.

**Πίνακας 2.** Ονομασία και διεθνής σύντμηση των είκοσι συνηθέστερων αμινοξέων των πρωτεϊνών με τρία γράμματα και ένα γράμμα [68].

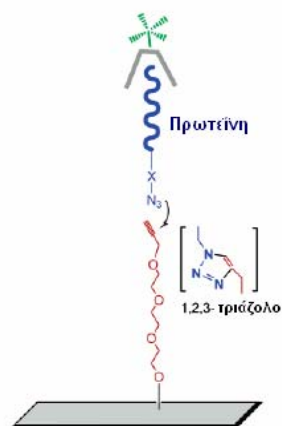
<b>Αμινοξέα</b>	<b>Συντομογραφία με τρία γράμματα</b>	<b>Συντομογραφία με ένα γράμμα</b>
Αλανίνη	Ala	A
Ασπαραγίνη	Asn	N
Κυστεΐνη	Cys	C
Γλουταμίνη	Gln	Q
Γλυκίνη	Gly	G
Ισολευκίνη	Ile	I
Λευκίνη	Leu	L
Μεθειονίνη	Met	M
Φαινυλαλανίνη	Phe	F
Προλίνη	Pro	P
Σερίνη	Ser	S
Θρεονίνη	Thr	T
Θρυπτοφάνη	Trp	W
Τυροσίνη	Tyr	Y
Βαλίνη	Val	V
Ασπαρτικό οξύ	Asp	D
Γλουταμικό οξύ	Glu	E
Αργινίνη	Arg	R
Ιστιδίνη	His	H
Λυσίνη	Lys	K



Σχήμα 17. Δομές των είκοσι συνηθέστερων αμινοξέων των πρωτεϊνών [69].

### 1.3.1. Χημική πρόσδεση

Οι πρωτεΐνες προσδένονται στα υποστρώματα μέσω των λειτουργικών ομάδων των εκτεθειμένων αμινοξέων. Για παράδειγμα η πλευρική ομάδα της λυσίνης είναι η αμινομάδα, η οποία μπορεί να αντιδράσει με επιφάνειες που περιέχουν εποξειδικές ομάδες, αλδεϋδομάδες ή καρβοξυλομάδες. Η πλευρική ομάδα του ασπαρτικού οξέος και του γλουταμικού οξέος είναι η καρβοξυλομάδα, η οποία μπορεί να αντιδράσει με επιφάνειες που έχουν τροποποιηθεί με αμινομάδες. Η πλευρική ομάδα της σερίνης και της θρεονίνης είναι η υδροξυλομάδα, η οποία μπορεί να αντιδράσει με εποξειδικές ομάδες που έχουν ακινητοποιηθεί στις επιφάνειες [70]. Οι χημικοί δεσμοί που δημιουργούνται μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων και κατάλληλα τροποποιημένων υποστρωμάτων έχουν ως αποτέλεσμα την υψηλή επικάλυψη της επιφάνειας. Αυτοί οι χημικοί δεσμοί είναι τυχαίοι αφού στηρίζονται σε ομάδες που υπάρχουν στο εξωτερικό της πρωτεΐνης και ορισμένες φορές συντελούν στην αύξηση της ετερογένειας των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών, καθώς η πρωτεΐνη μπορεί να έχει ακινητοποιηθεί σε περισσότερα από ένα σημεία [70].



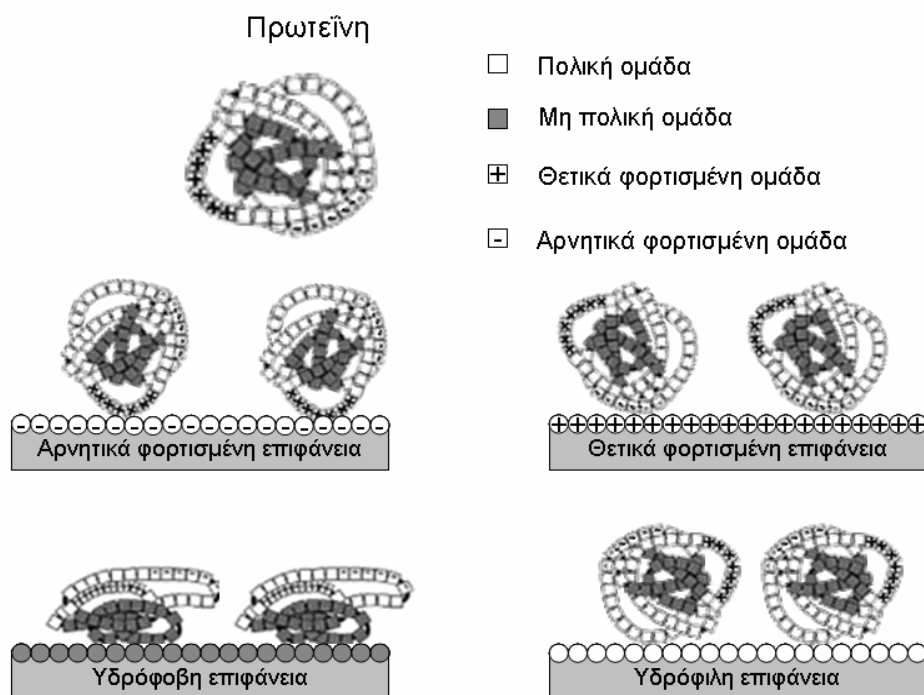
Σχήμα 18. Παράδειγμα πρωτεΐνης τροποποιημένης με αζιδομάδα (azide), η οποία προσδένεται σε επιφάνεια γυαλιού που έχει τροποποιηθεί με ΑΜΣ που φέρει ως τερματική ομάδα μία αλκινο-ομάδα [71].



Όμως, οι χημικοί δεσμοί μπορούν να καθοδηγηθούν με πιο οργανωμένο τρόπο, έτσι ώστε να διατηρηθεί ο προσανατολισμός της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης και να αποφευχθεί η μετουσίωσή της εάν επιλεγεί να γίνει η πρόσδεση μέσω εξειδικευμένων αντιδράσεων. Αυτοί οι χημικοί δεσμοί, συνήθως, απαιτούν την ενεργοποίηση του βιομορίου και την ενεργοποίηση της επιφάνειας [71, 72]. Ένα παράδειγμα ακινητοποίησης μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης σε κατάλληλα τροποποιημένο υπόστρωμα απεικονίζεται στο Σχήμα 18.

### 1.3.2. Φυσική προσρόφηση

Στην περίπτωση της φυσικής προσρόφησης οι πρωτεΐνες προσροφώνται στην επιφάνεια μέσω διαμοριακών δυνάμεων, κυρίως ιοντικών δεσμών, υδρόφοβων και πολικών αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 19). Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται σε κάθε περίπτωση έχουν σχέση με την πρωτεΐνη που ακινητοποιείται και την επιφάνεια. Το στρώμα των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών είναι ετερογενές και τυχαία προσανατολισμένο καθώς κάθε μόριο πρωτεΐνης μπορεί να αλληλεπιδρά με την επιφάνεια έχοντας διαφορετικό προσανατολισμό έτσι ώστε τελικά να μειθούν οι απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας και των ήδη ακινητοποιημένων πρωτεϊνών. Η ικανότητα προσρόφησης των επίπεδων επιφανειών περιορίζεται από το γεωμετρικό μέγεθος της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης. Η πυκνή ακινητοποίηση των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει δέσμευση στις ενεργές περιοχές της πρωτεΐνης, επεμβαίνοντας σε λειτουργικές ιδιότητές της [70].



Σχήμα 19. Μηχανισμοί για τη φυσική προσρόφηση πρωτεϊνών [73].

Η φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών είναι επιθυμητή σε εφαρμογές όπως στη μεταφορά φαρμάκων (drug delivery) και στην απομάκρυνση φαρμακευτικών πρωτεϊνών από διάφορα μέσα [74].

Τα μειονεκτήματα της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών είναι ο τυχαίος προσανατολισμός και η ασταθής ακινητοποίησή τους, καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο να απομακρυνθούν από ορισμένα ρυθμιστικά διαλύματα ή τασιενεργά που

χρησιμοποιούνται στις διεργασίες. Επίσης, μπορεί να ακινητοποιηθούν πρωτεΐνες σε περιοχές που δεν πρέπει να ακινητοποιηθούν, γιατί είναι πολύ δύσκολο να αποτραπεί η φυσική προσρόφηση σε στερεές επιφάνειες με αποτέλεσμα να λαμβάνεται σήμα ή μεγάλος θόρυβος κατά την ανίχνευση των πρωτεϊνών από περιοχές στις οποίες είναι απαραίτητο να αποτραπεί η φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών [70].

### 1.3.3. Αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών

Η αποτροπή της προσρόφησης είναι ιδιαίτερα σημαντική σε εμφυτεύσιμα υλικά. Όταν ένα βιοϋλικό έρχεται σε επαφή με βιολογικά υγρά τότε μέσα σε μερικά ns μόρια νερού προσεγγίζουν την επιφάνεια και σχηματίζουν ένα κέλυφος ενυδάτωσης (hydration shell). Η αλληλεπίδραση των μορίων νερού με την επιφάνεια εξαρτάται από τις ιδιότητες της επιφάνειας. Οι ιδιότητες της επιφάνειας καθορίζουν επίσης ποιες πρωτεΐνες και ποια άλλα μόρια θα προσροφηθούν στη συνέχεια. Επομένως, στο δεύτερο στάδιο στην επιφάνεια προσροφώνται πρωτεΐνες οι οποίες υπάρχουν στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Το στάδιο αυτό διαρκεί από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι κάποιες ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα «φτάνουν» στην επιφάνεια και αλληλεπιδρούν με τις προσροφημένες πρωτεΐνες. Αυτό το στάδιο επηρεάζεται από βιολογικά μόρια, όπως πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, πρωτεΐνες που υπάρχουν στη μεμβράνη των κυττάρων και τον κυτταροσκελετό, από το βιοφυσικό περιβάλλον και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας, όπως τη χημική σύσταση και τη νανο- και μικρο-τοπογραφία της, από προϊόντα που αποδεσμεύονται από το υλικό και από την μικροδομή του (πορώδες) και διαρκεί από μερικά λεπτά μέχρι κάποιες μέρες. Όσο ο χρόνος αυξάνεται τόσο τα κύτταρα προσκολλώνται, μεταναστεύουν και διαφοροποιούνται [75].

Για την αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ευρέως η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (Polyethylene glycol, PEG). Για παράδειγμα ΑΜΣ πολυ(αιθυλενογλυκόλης) σχηματίζεται με την ακινητοποίηση του  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{EG}_n\text{OH}$  σε μεταλλικές επιφάνειες χρυσού ή τιτανίου [60]. Αντίστοιχα, σε επιφάνεια πυριτίου το ΑΜΣ πολυ(αιθυλενογλυκόλης) σχηματίζεται μέσω της ακινητοποίησης του  $\text{PEG-OSiCl}_3$  [76, 77]. Επίσης, ακινητοποιούνται συμπολυμερή του PEG. Για την ακινητοποίηση του PEG σε επιφάνειες χρυσού χρησιμοποιείται το τριπολυμερές PEG-PPS-PEG (PPS: polypropylene sulphide, πολυπροπυλενοσουλφίδιο) [78]. Για την ακινητοποίηση του PEG σε υδρόφοβες επιφάνειες χρησιμοποιείται το τριπολυμερές PEG-PPO-PEG (PPO: polypropylene oxide, πολυπροπυλενοξείδιο) [79, 80, 81]. Για την ακινητοποίηση του PEG σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες (π.χ. οξείδια μετάλλων) χρησιμοποιείται το συμπολυμερές PLL-g-PEG (PLL: poly-L-lysine, πολυ-L-λυσίνη) [82]. Το PLL-g-PEG μπορεί επίσης να ακινητοποιηθεί σε επιφάνειες τροποποιημένες με αλδεϋδομάδες [83].

Έχουν προταθεί πολλές θεωρίες που αφορούν την αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών από το PEG. Ο Andrade και οι συνεργάτες του [84, 85, 86] υποστηρίζουν ότι η διεργασία προκειμένου να προσροφηθεί η πρωτεΐνη σε μία επιφάνεια στην οποία έχει ακινητοποιηθεί το PEG δεν ευνοείται θερμοδυναμικά (είναι θερμοδυναμικά μη επιτρεπτή), καθώς για να προσροφηθεί μία πρωτεΐνη στην επιφάνεια πρέπει να συμπιεστούν και να αφυδατωθούν οι αλυσίδες του PEG (steric repulsion model). Ο McPherson και οι συνεργάτες του [87] υποστηρίζουν ότι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την ικανότητα ενός πολυμερικού στρώματος να αποτρέπει την προσρόφηση των πρωτεϊνών είναι η επικάλυψη της επιφάνειας καθώς πρέπει να μπλοκάρονται οι περιοχές στις οποίες μπορεί να προσροφηθεί μία πρωτεΐνη. Ο Grunze και οι συνεργάτες του [88, 89, 90] μελέτησαν ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης και βρήκαν ότι τα ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης που είχαν

ακίνητοποιηθεί σε χρυσό είχαν μία ελικοειδή διαμόρφωση, ενώ τα ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης που είχαν ακίνητοποιηθεί σε άργυρο είχαν μία “all trans” διαμόρφωση. Στα ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης που είχαν ακίνητοποιηθεί σε άργυρο προσροφήθηκε το ιωδογόνο, ενώ στα ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης που είχαν ακίνητοποιηθεί σε χρυσό δεν προσροφήθηκε το ιωδογόνο. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση των μορίων του νερού με τα ΑΜΣ είναι πολύ σημαντική για την αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών καθώς τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι περισσότερα μόρια νερού σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης που είχαν ακίνητοποιηθεί σε χρυσό και είχαν την ελικοειδή διαμόρφωση σε σχέση με τα ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης που είχαν ακίνητοποιηθεί σε άργυρο. Ο Latour [91] προτείνει ότι για να αποτρέψει μία επιφάνεια την προσρόφηση των πρωτεϊνών πρέπει να είναι καλά ενυδατωμένη, να έχει μακριές και ευέλικτες αλυσίδες, οι αλυσίδες της να μπορούν να κινηθούν αλλά παράλληλα να καλύπτουν πλήρως την επιφάνεια και οι αλυσίδες του πολυμερούς να περιέχουν ομάδες οι οποίες να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μόρια νερού μέσω δεσμών υδρογόνου, αλλά να μην μπορούν να σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου με ομάδες των πρωτεϊνών. Ο Zheng και οι συνεργάτες του [92] υποστηρίζουν ότι η αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών σχετίζεται με τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης με τα μόρια του νερού. Επίσης η κινητικότητα των ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης είναι σημαντική.

Εκτός από το PEG υπάρχουν και άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών στις επιφάνειες. Ο τετρα-αιθυλο γλυκίλ διμεθυλοαιθέρας (tetraethylene glycol dimethyl ether) (tetraglyme)  $\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_4\text{-CH}_3$  είναι ένα υλικό που μοιάζει με το PEG και έχει χρησιμοποιηθεί για να αποτρέψει την προσρόφηση πρωτεϊνών και την προσκόλληση κυττάρων [93]. ΑΜΣ που περιέχουν ομάδες μαννιτόλης έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων [94]. Τα ΑΜΣ μαννιτόλης συγκρίθηκαν με τα ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης και βρέθηκε ότι τα ΑΜΣ μαννιτόλης διατηρούν για περισσότερες μέρες την ικανότητά τους να αποτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων σε επιλεγμένες περιοχές [94]. Η οξειδωμένη δεξτράνη [95] καθώς και συμπολυμερή που περιέχουν δεξτράνη [96] έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών. Επίσης, δενδρίτες πολυγλυκερόλης (polyglycerol dendrons) [97] με διαφορετικές τερματικές ομάδες (-OH, -OCH<sub>3</sub>) έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών. Ο πολυ(μεθακρυλικός 2-υδροξυπροπυλεστέρας) (hydroxypropyl methacrylate) έχει χρησιμοποιηθεί για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων [98]. Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς εσωτερικά φορτισμένα πολυμερή (zwitterionic polymers), τα οποία φέρουν θετικά και αρνητικά φορτία στη δομή τους, για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων [62, 63]. Η αποτροπή της προσρόφησης βιολογικού υλικού από τα εσωτερικά φορτισμένα πολυμερή αποδίδεται στη διατήρηση των δεσμών υδρογόνου στα μόρια του νερού που το περιβάλλουν κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης σε διαλύματα πρωτεϊνών, δηλαδή η παρουσία του εσωτερικά φορτισμένου πολυμερούς δεν επηρεάζει το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου που έχουν αναπτυχθεί μεταξύ των μορίων του νερού [99].

Επίσης, για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων χρησιμοποιούνται υλικά τα οποία μιμούνται την επιφάνεια του ενδοθηλίου καθώς είναι γνωστό ότι η πήξη του αίματος δεν λαμβάνει χώρα στο ενδοθήλιο. Η επιφάνεια του ενδοθηλίου μπορεί να αναπαρασταθεί με την ακίνητοποίηση μορίων παρόμοιας δομής με το πολικό άκρο των φωσφολιπιδίων, όπως της φωσφορυλοχολίνης ή

συνθετικών αναλόγων [73]. Η φωσφορυλοχολίνη έχει ακινητοποιηθεί σε επεξεργασμένο πολυ(τετραφθοροαιθυλένιο) με αποτέλεσμα να μειώσει την προσκόλληση των κυττάρων [100]. Επίσης συμπολυμερή που περιέχουν τη 2-μεθακρυλοϋλοξυαιθυλο φωσφορυλοχολίνη χρησιμοποιούνται ευρέως για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων [101, 102].

Επίσης, η ηπαρίνη χρησιμοποιείται για την αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών και κυττάρων. Οι Yang και Lin ακινητοποίησαν την ηπαρίνη σε μια μεμβράνη από πολυσουλφόνη. Επεξεργασία της πολυσουλφόνης με όζον οδηγεί στο σχηματισμό ενεργών υπεροξειδίων, στα οποία προσδέθηκε ακρυλικό οξύ. Η ηπαρίνη προσδέθηκε είτε απευθείας στα καρβοξύλια του ακρυλικού οξέος μέσω χημείας καρβοδιϊμιδίου είτε μέσω συνδέσμου κυτοσίνης-γλουταραλδεϋδης (chitosan-glutaraldehyde linkage). Το ποσό της ηπαρίνης που ακινητοποιείται αυξάνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους της κυτοσίνης με αποτέλεσμα να μειώνεται η προσρόφηση πρωτεϊνών και κυττάρων [103].

#### **1.4. Προσκόλληση κυττάρων στις στερεές επιφάνειες**

Τα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών πρέπει να προσκολληθούν σε μία επιφάνεια για να επιβιώσουν [104]. Σε αντίθεση με τα εμφυτεύσιμα υλικά στα οποία η προσκόλληση των κυττάρων είναι ανεπιθύμητη στη μηχανική των ιστών [73] καθώς και στις καλλιέργειες κυττάρων η προσκόλληση των κυττάρων σε επιφάνειες είναι επιθυμητή.

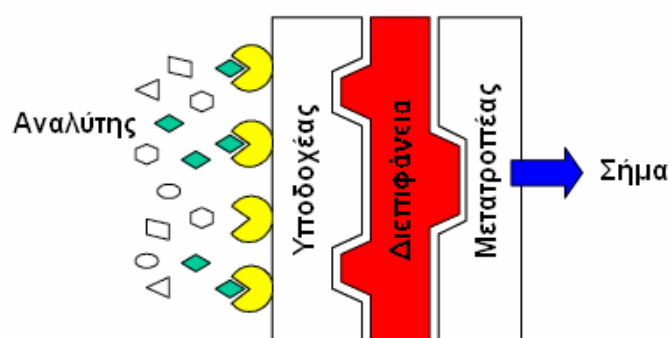
Έχει μελετηθεί η προσκόλληση κυττάρων σε πολλά υλικά όπως πυρίτιο [105], μέταλλα [106], πολυμερή [107, 108] κ.ά. Επίσης έχει γίνει τροποποίηση των υποστρωμάτων με πολυαμινοξέα [109] ή με ΑΜΣ [110], προκειμένου να ακινητοποιηθούν κύτταρα. Για παράδειγμα επιφάνεια γυαλιού τροποποιημένη με πολυ(λυσίνη) χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση κυττάρων [109]. Μία μέθοδος για την ενίσχυση της προσκόλλησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι η ακινητοποίηση σε μία επιφάνεια πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [73]. Το κολλαγόνο είναι πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και έχει ακινητοποιηθεί σε πολλές επιφάνειες προκειμένου να ενισχύσει την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων. Για παράδειγμα το κολλαγόνο έχει ακινητοποιηθεί σε υπόστρωμα πολυ(καπρολακτόνης) με αποτέλεσμα τη βελτίωση της προσκόλλησης και του πολλαπλασιασμού ανθρώπινων ινοβλαστών και μυοβλαστών [111]. Μία άλλη πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι η φιμπρονεκτίνη. Ο Podolnikova και η ομάδα του [112] έδειξαν ότι όταν η φιμπρονεκτίνη ακινητοποιείται σε μία επιφάνεια δημιουργώντας ένα στρώμα τότε ενισχύει την ακινητοποίηση αιμοπεταλίων από ανθρώπινο αίμα.

Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι μεγάλα μόρια, τα οποία μπορούν κατά την διάρκεια της ακινητοποίησης να χάσουν την ενεργότητά τους [104]. Γι' αυτό προτιμάται να ακινητοποιούνται στις επιφάνειες οι αλληλουχίες των αμινοξέων [104, 113] οι οποίες αναγνωρίζονται από τις ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα η πιο γνωστή αλληλουχία αμινοξέων, η οποία για πρώτη φορά ανακαλύφθηκε στη φιμπρονεκτίνη είναι η αλληλουχία Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαρτικού οξέος (Arg-Gly-Asp, RGD), η οποία στη συνέχεια ανακαλύφθηκε και σε άλλες πρωτεΐνες προσκόλλησης [104]. Η τροποποίηση πολυμερικών αλυσίδων (ψηκτρών) με το τριπεπτίδιο Αργινίνη-Γλυκίνη-Ασπαρτικό οξύ (Arg-Gly-Asp, RGD) έχει εφαρμοστεί για την ακινητοποίηση αγγειακών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώρο [114].

## 1.5. Αναγκαιότητα για επιλεκτική πρόσδεση βιολογικού υλικού

Σε πολλές εφαρμογές είναι απαραίτητη η σχηματοποίηση του βιολογικού υλικού. Ορισμένες εφαρμογές στις οποίες απαιτείται η σχηματοποίηση του βιολογικού υλικού είναι οι βιοαισθητήρες, οι μικροσυστοιχίες, μελέτες που αφορούν τα κύτταρα και ανάπτυξη συν-καλλιιεργειών.

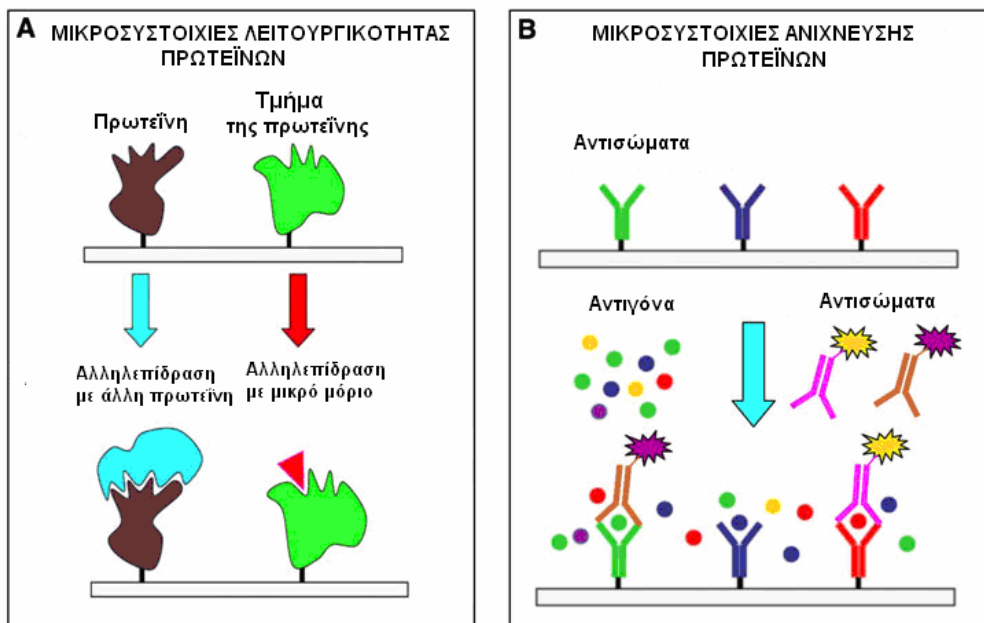
Ένας βιοαισθητήρας αποτελείται από τον υποδοχέα, ο οποίος αντιδρά με τον αναλύτη και τον μετατροπέα, ο οποίος καταγράφει τη βιοχημική μεταβολή. Οι υποδοχείς στους βιοαισθητήρες είναι συνήθως ένζυμα, αντισώματα, DNA, μικροοργανισμοί, τα οποία ακινητοποιούνται στον μετατροπέα (Σχήμα 20). Μία πολύ σημαντική παράμετρος για τη σωστή λειτουργία του βιοαισθητήρα είναι η πρόσδεση του βιολογικού υλικού στην επιφάνεια του μετατροπέα [115].



Σχήμα 20. Τυπική δομή ενός βιοαισθητήρα [115].

Σχηματοποίηση βιολογικού υλικού απαιτείται και στις μικροσυστοιχίες. Στις μικροσυστοιχίες τα βιομόρια είναι ακινητοποιημένα σε μία στερεή επιφάνεια σε γραμμές και στήλες και εκτίθενται σε δείγματα προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με συμπληρωματικά βιομόρια. Οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών διακρίνονται στις μικροσυστοιχίες λειτουργικότητας (functional protein microarrays) και στις μικροσυστοιχίες ανίχνευσης (protein detecting microarrays) (Σχήμα 21). Οι μικροσυστοιχίες λειτουργικότητας πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών ή μεταξύ ενός τμήματος μίας πρωτεΐνης με ένα μικρό μόριο ή μεταξύ ενός ενζύμου και ενός υποστρώματος. Οι μικροσυστοιχίες ανίχνευσης πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση και ανίχνευση βιομορίων σε δείγματα [116].

Η σχηματοποίηση των κυττάρων [117] είναι πολύ σημαντική για μελέτες που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις των βιοϋλικών με τα κύτταρα [118] και για μελέτες που αφορούν τα κύτταρα [119]. Ο Chen και η ομάδα του [120] διαπίστωσαν ότι το μέγεθος και η γεωμετρία των δομών στις οποίες προσκολλώνται τα κύτταρα καθορίζει το σχήμα των κυττάρων και υπήρξε ένας συσχετισμός μεταξύ του σχήματος των κυττάρων με τη λειτουργία τους. Επίσης, η σχηματοποίηση των κυττάρων είναι σημαντική για την ανάπτυξη συν-καλλιιεργειών, οι οποίες χρησιμεύουν στις μελέτες των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ κυττάρων διαφορετικού είδους [119]. Ένα παράδειγμα είναι συν-καλλιιεργεία νευρικών βλαστικών κυττάρων με μικρογλοία με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε αστροκύτταρα [121].



**Σχήμα 21.** Παραδείγματα: Α) Μικροσυστοιχίας λειτουργικότητας πρωτεϊνών Β) Μικροσυστοιχίας ανίχνευσης πρωτεϊνών [116].

Στις εφαρμογές που προαναφέρθηκαν είναι απαραίτητη η σχηματοποίηση των βιομορίων και των κυττάρων, δηλαδή η ακινητοποίηση τους σε συγκεκριμένες περιοχές σε μία στερεή επιφάνεια. Συνήθως η σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων επιτυγχάνεται σε στερεές επιφάνειες, οι οποίες έχουν σχηματοποιηθεί έτσι ώστε να συνυπάρχουν περιοχές που ευνοούν τις αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας με τα βιομόρια και τα κύτταρα και περιοχές που αποτρέπουν την πρόσδεση βιομορίων και κυττάρων. Όμως, υπάρχουν και τεχνικές που στηρίζονται στην εναπόθεση βιομορίων σε συγκεκριμένα σημεία της επιφάνειας, αλλά και σε αυτές τις τεχνικές είναι επιθυμητό οι περιοχές, στις οποίες δεν προσδένονται τα βιομόρια να είναι κατάλληλα σχεδιασμένες έτσι ώστε να αποτρέπεται η πρόσδεση τους, για να μπορούν οι επιφάνειες αυτές στη συνέχεια να αξιοποιηθούν περαιτέρω. Για να επιτευχθεί η σχηματοποίηση των βιομορίων και των κυττάρων εφαρμόζονται οι τεχνικές λιθογραφίας, οι οποίες αναλύονται στο Κεφάλαιο 2.

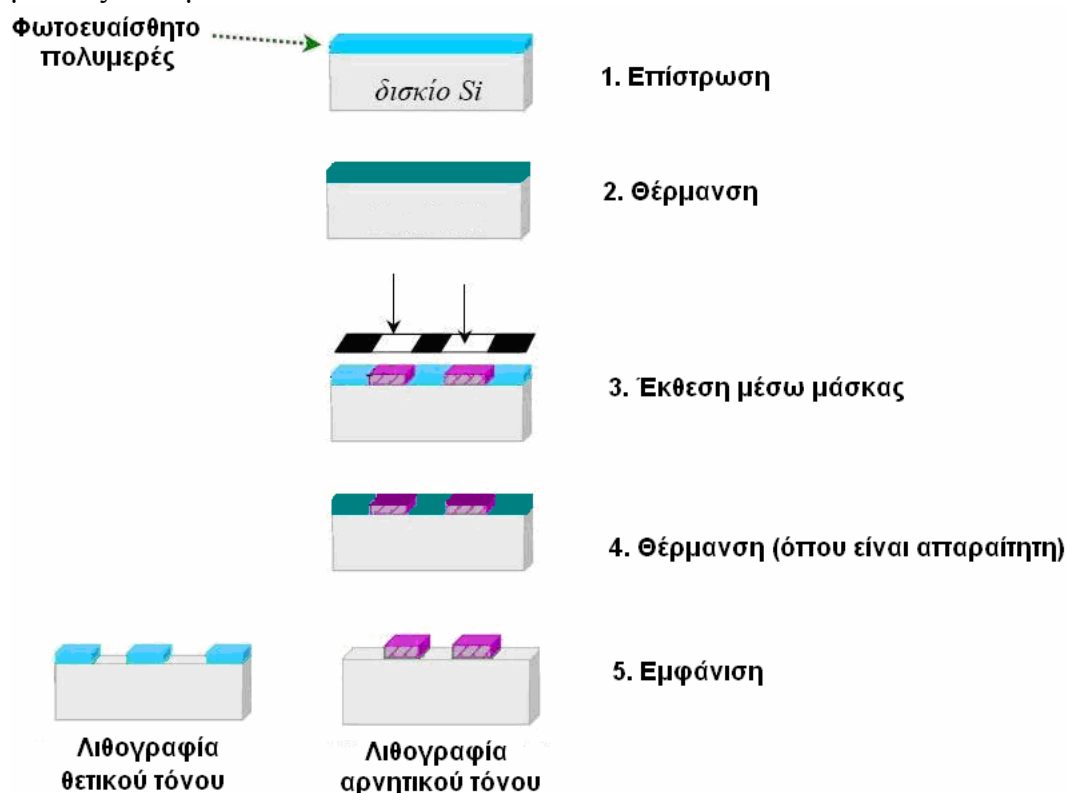
## 2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΙΘΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ο όρος λιθογραφία αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τη διεργασία αποτύπωσης σχήματος κατά την οποία ένα μη πολικό μελάνι επικαλύπτει μία υδρόφιλη μήτρα η οποία φέρει μία υδρόφοβη εικόνα [122, 123]. Ο όρος αυτός πλέον αναφέρεται σε πλήθος τεχνικών οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αποτύπωση σχήματος σε ένα υπόστρωμα [123, 124]. Στη συνέχεια αναφέρονται οι κυριότερες τεχνικές λιθογραφίας, δηλαδή η φωτολιθογραφία, η εύπλαστη λιθογραφία (εγγραφή με μικροεπαφή), η λιθογραφία νανοαποτυπώματος και η λιθογραφία με ακίδες σάρωσης.

### 2.1. Φωτολιθογραφία

Το βασικό σύστημα της φωτολιθογραφίας ή οπτικής λιθογραφίας αποτελείται από την πηγή έκθεσης, το οπτικό σύστημα και τη μάσκα. Η αρχή της φωτολιθογραφίας είναι η έκθεση μέσω μάσκας ενός πολυμερικού υμενίου σε

ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία οδηγεί στη μεταφορά του σχεδίου της μάσκας στο υμένιο.



**Σχήμα 22.** Λιθογραφία για την αποτύπωση σχήματος σε φωτοευαίσθητο υμένιο [125].

Αναλυτικότερα, τα στάδια που αποτελούν τη διεργασία της φωτολιθογραφίας είναι (Σχήμα 22):

1. Εναπόθεση του φωτοευαίσθητου πολυμερικού υλικού σε μορφή διαλύματος με απόχυση πάνω σε κατάλληλο υπόστρωμα πυριτίου και σχηματισμός ενός λεπτού πολυμερικού υμενίου μέσω περιστροφής.

2. Θέρμανση του υποστρώματος σε κατάλληλη θερμοκρασία με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύτη και την ομογενοποίηση του υμενίου.

3. Έκθεση του φωτοευαίσθητου υλικού μέσω μάσκας. Στη μάσκα είναι αποτυπωμένο το επιθυμητό σχήμα, το οποίο μεταφέρεται στο πολυμερικό υμένιο μέσω μεταβολών που προκαλεί η ακτινοβολία στις εκτεθειμένες περιοχές. Στις περιοχές αυτές πραγματοποιούνται φωτοχημικές αντιδράσεις που οδηγούν σε αλλαγή της διαλυτότητας του πολυμερικού υλικού.

4. Θέρμανση του υμενίου σε κατάλληλη θερμοκρασία με σκοπό την εκκίνηση ή την κατάλυση της χημικής αντίδρασης που ακολουθεί τη φωτοχημική αντίδραση. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε υλικά στα οποία η φωτοχημική αντίδραση δεν ολοκληρώνει τη διαδικασία αλλαγής διαλυτότητας αλλά παράγει καταλύτη, ο οποίος ενεργοποιεί αντιδράσεις που οδηγούν σε αλλαγή της διαλυτότητας.

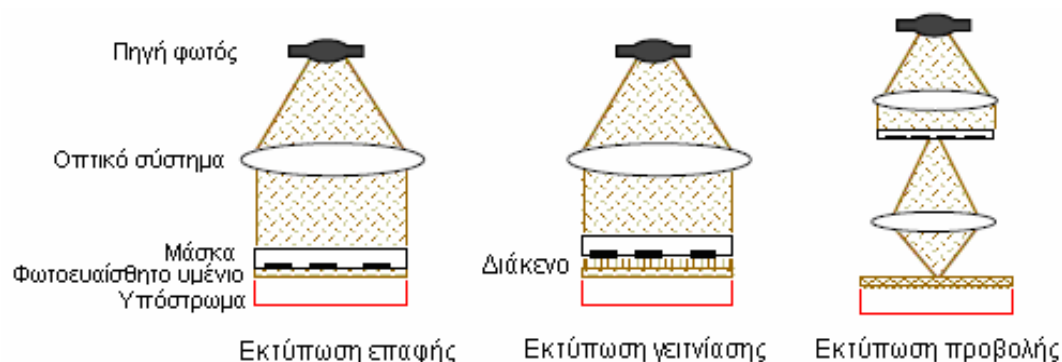
5. Εμφάνιση μέσω εμβάπτισης σε κατάλληλο διαλύτη. Κατά τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται οι εκτεθειμένες περιοχές (λιθογραφία θετικού τόνου) ή οι ανέκθετες περιοχές (λιθογραφία αρνητικού τόνου).

Μετά την ολοκλήρωση αυτής της διεργασίας έχει αποτυπωθεί στο πολυμερικό υμένιο το σχέδιο της μάσκας [123, 126]. Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσουν άλλες διεργασίες, όπως π.χ. μεταφορά σχήματος στο υποκείμενο στρώμα με εγχάραξη ή ιοντική εμφύτευση.

Οι διάφορες φωτολιθογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το είδος της εκτύπωσης και την ενέργεια που χρησιμοποιείται για την έκθεση του φωτοπολυμερικού υλικού. Η μικρότερη δομή που μπορεί να αποτυπωθεί στο υμένιο εξαρτάται από το σύστημα εκτύπωσης, την πηγή έκθεσης και το υλικό του φωτοπολυμερικού υμενίου.

### 2.1.1. Συστήματα εκτύπωσης

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τρόποι μεταφοράς του σχεδίου της μάσκας στο φωτοευαίσθητο υμένιο: η εκτύπωση επαφής, γειννίασης και προβολής (Σχήμα 23).



Σχήμα 23. Τα τρία διαφορετικά είδη εκτύπωσης: επαφής, γειννίασης και προβολής [126].

#### 2.1.1.1. Εκτύπωση επαφής

Στην εκτύπωση επαφής (contact printing) η μάσκα και το υπόστρωμα έρχονται σε άμεση επαφή με την εφαρμογή κενού. Η εκτύπωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποτύπωση 1:1 του σχεδίου της μάσκας πάνω στο φωτοευαίσθητο υμένιο. Ανάλογα με το σχέδιο που περιέχει η μάσκα είναι δυνατή η εκτύπωση δομών με πολύ μικρές διαστάσεις. Η τεχνική αυτή έχει υψηλή διακριτική ικανότητα αλλά παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Από την επαφή της μάσκας με το υπόστρωμα δημιουργούνται χαραγές με αποτέλεσμα τη φθορά της μάσκας. Άλλοι παράγοντες που μειώνουν την ακρίβεια της μεθόδου είναι σκόνη ή υπολείμματα ανάμεσα στις επιφάνειες που εφάπτονται, τα οποία δημιουργούνται λόγω τριβής της μάσκας με το επιστρωμένο δισκίο πυριτίου και εισάγουν προβλήματα στην εκτύπωση του σχήματος. Επίσης, προβλήματα στην εκτύπωση του σχήματος απορρέουν από την έλλειψη απολύτως επίπεδης επιφάνειας τόσο στη μάσκα όσο και στο λεπτό υμένιο, τα οποία οδηγούν σε φαινόμενα περίθλασης εγγύς πεδίου (Fresnel diffraction), τα οποία υποβαθμίζουν την ποιότητα της εικόνας που αποτυπώνεται στο υμένιο [123, 126]. Για τους λόγους αυτούς η εκτύπωση επαφής χρησιμοποιείται, κυρίως, σε εργαστηριακή κλίμακα για ερευνητικούς σκοπούς και όχι σε βιομηχανική παραγωγή.

#### 2.1.1.2. Εκτύπωση γειννίασης

Στην εκτύπωση γειννίασης (proximity printing) υπάρχει ένα μικρό διάκενο μεταξύ του φωτοευαίσθητου υμενίου και της μάσκας της τάξεως των 5-25  $\mu\text{m}$ . Σε αυτό το είδος εκτύπωσης αντιμετωπίζεται το πρόβλημα της σωματιδιακής μόλυνσης που προκαλείται στο φωτοευαίσθητο υμένιο κατά την επαφή του με τη μάσκα και περιορίζεται η καταστροφή της μάσκας αλλά ενισχύονται φαινόμενα περίθλασης με αποτέλεσμα να μειώνεται η διακριτική ικανότητα. Χρησιμοποιώντας ως πηγή έκθεσης ακτίνες X επιτυγχάνεται υψηλή διακριτική ικανότητα [123, 126].



Στην εκτύπωση γειννίασης και επαφής, λόγω των φαινομένων περίθλασης Fresnel (περίθλαση εγγύς πεδίου), η ένταση της ακτινοβολίας δεν είναι ίδια κατά μήκος της διαφανούς διάστασης της μάσκας, αυξάνεται βαθμιαία κοντά στις άκρες ενώ εκτίθενται λίγο και περιοχές κοντά στις άκρες των σκοτεινών περιοχών της μάσκας.

Η διακριτική ικανότητα των συστημάτων γειννίασης μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$W_{\min} \approx \sqrt{\lambda g}, \text{ όταν } \lambda < g < \frac{W^2}{\lambda} \quad (2)$$

Όπου  $\lambda$ , το μήκος κύματος της πηγής έκθεσης

$g$ , η απόσταση της μάσκας από το φωτοευαίσθητο υμένιο (Σχήμα 23 εκτύπωση γειννίασης).

Επομένως ένα σύστημα γειννίασης στο οποίο χρησιμοποιείται διάκενο  $g=10\mu\text{m}$  και χρησιμοποιεί ακτινοβολία μήκους κύματος  $365\text{ nm}$  (i-line) μπορεί να αποτυπώσει μέχρι  $1.9\mu\text{m}$  [126].

### 2.1.1.3. Εκτύπωση προβολής

Τα προβλήματα που προκύπτουν από την εκτύπωση επαφής και γειννίασης αντιμετωπίζονται με τη χρήση των συστημάτων εκτύπωσης με προβολή της μάσκας πάνω στο δισκίο, καθώς αποφεύγεται η επαφή της μάσκας με το φωτοευαίσθητο υμένιο. Στην εκτύπωση προβολής (projection printing) χρησιμοποιούνται υψηλής ποιότητας φακοί για την προβολή του σχεδίου της μάσκας πάνω στο φωτοευαίσθητο υμένιο. Η μάσκα προβάλλεται στο φωτοευαίσθητο υμένιο σε διαστάσεις 4:1 ή 5:1 και κατά συνέπεια οι απαιτήσεις στην κατασκευή των μασκών δεν είναι τόσο υψηλές.

Για να εκτεθεί όλο το δισκίο χρησιμοποιείται το σύστημα βηματικής έκθεσης (stepper). Στο σύστημα βηματικής έκθεσης το δισκίο βρίσκεται πάνω σε μια μετακινούμενη βάση και μπορεί να μετακινηθεί κατά τους άξονες  $x$  και  $y$ . Η έκθεση γίνεται σε μία θέση για μια ψηφίδα και εν συνεχεία μετακινείται η βάση και γίνεται έκθεση για μια άλλη ψηφίδα έτσι ώστε να εκτεθούν βήμα βήμα όλες οι περιοχές του. Το σύστημα παρουσιάζει υψηλή διακριτική ικανότητα, αλλά η αναγκαιότητα για τη χρήση πολύπλοκων οπτικών και μηχανικών συστημάτων αυξάνει πολύ το κόστος του [123, 126]. Συστήματα τέτοιου τύπου χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παραγωγής ολοκληρωμένων κυκλωμάτων.

Η διακριτική ικανότητα των συστημάτων προβολής μπορεί να προσδιοριστεί από τη σχέση:

$$W = \frac{k\lambda}{NA} \quad (3)$$

Όπου  $W$ , το ελάχιστο μέγεθος εικονοστοιχείου

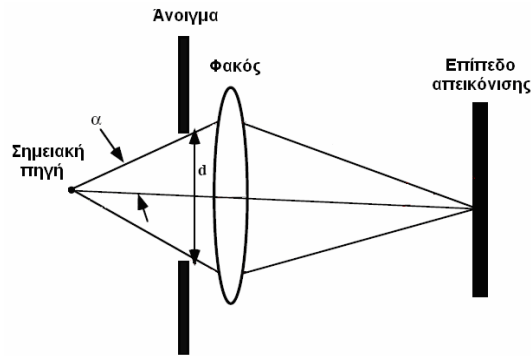
$k$ , μια εμπειρική σταθερά που εξαρτάται από το υλικό και τη λιθογραφική διεργασία

$\lambda$ , το μήκος κύματος της ακτινοβολίας

$NA$ , το αριθμητικό άνοιγμα του φακού.

Το αριθμητικό άνοιγμα υπολογίζεται από τη σχέση  $NA = n \sin \alpha$ , όπου  $n$  είναι ο δείκτης διάθλασης του μέσου στο οποίο βρίσκεται ο φακός και  $\alpha$  είναι η γωνία που απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα και σχετίζεται με την ικανότητα του φακού να συλλέγει την ακτινοβολία (Σχήμα 24).

Η διακριτική ικανότητα αυξάνεται με μείωση του μήκους κύματος και αύξηση του αριθμητικού ανοίγματος [126].



Σχήμα 24. Ορισμός αριθμητικού ανοίγματος  $NA = n \cdot \sin \alpha$  [126].

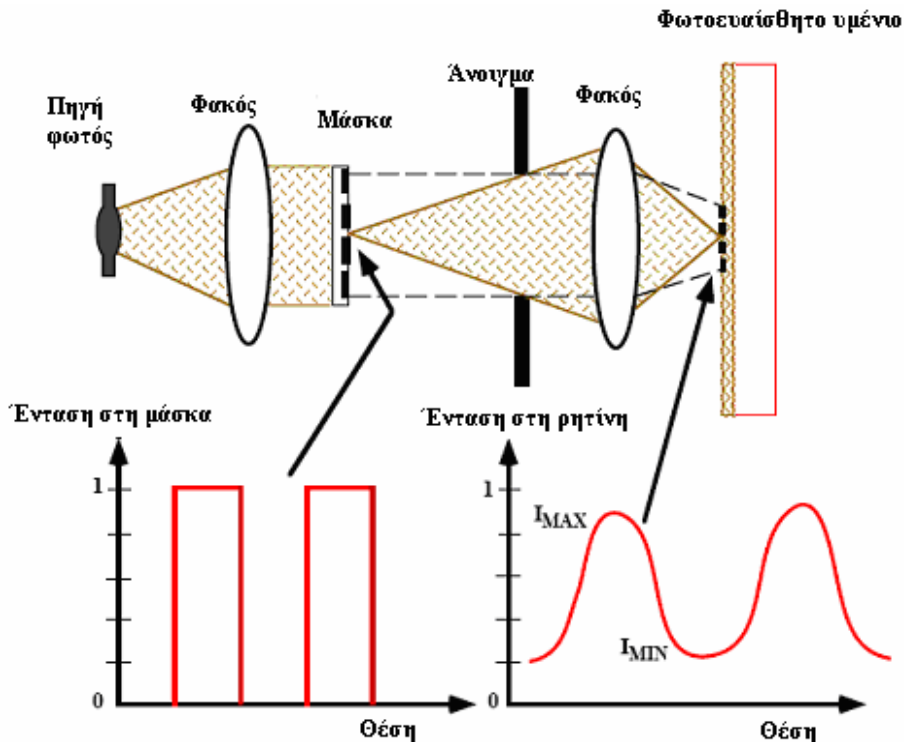
Στην εκτύπωση προβολής λόγω των φαινομένων περίθλασης Fraunhofer (περίθλαση μακρινού πεδίου) η ένταση της ακτινοβολίας που φτάνει στο φωτοευαίσθητο υμένιο από τις διαφανείς περιοχές της μάσκας δεν είναι ίδια σε όλες τις περιοχές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια περιοχή που πρέπει να εκτεθεί να εκτίθεται τελικά ανεπαρκώς, ενώ μια περιοχή που δεν πρέπει να εκτεθεί να μην παραμένει απολύτως ανέκθετη. Επομένως, η μέγιστη ένταση της ακτινοβολίας στη ρητίνη να μην αντιστοιχεί στο 1 (Σχήμα 25). Η ποιότητα της μεταφοράς της έντασης της ακτινοβολίας μπορεί να περιγραφεί από το δείκτη τροποποίησης, ο οποίος ορίζεται από τη σχέση [123, 126]:

$$MTF = \frac{I_{MAX} - I_{MIN}}{I_{MAX} + I_{MIN}} \quad (4)$$

Όπου  $I_{MAX}$ , η μέγιστη ένταση της ακτινοβολίας

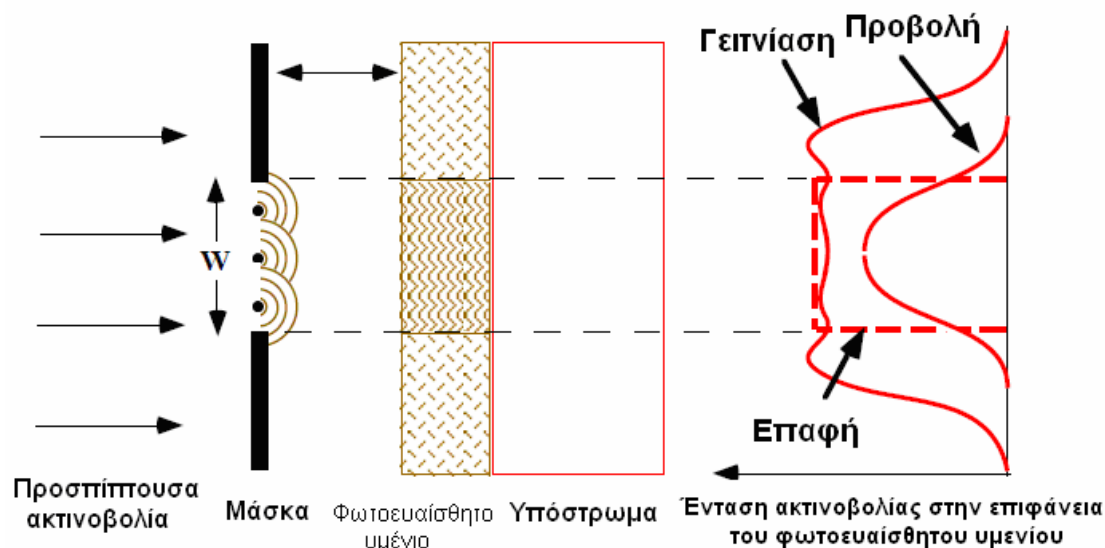
$I_{MIN}$ , η ελάχιστη ένταση της ακτινοβολίας

Στην ιδανική περίπτωση η  $I_{MAX}=1$  και  $I_{MIN}=0$  επομένως ο δείκτης τροποποίησης θα έπρεπε να ισούται με τη μονάδα, αλλά πρακτικά ο δείκτης τροποποίησης είναι μικρότερος από τη μονάδα.



Σχήμα 25. Προσδιορισμός δείκτη τροποποίησης [126].

Συγκριτικά, η καλύτερη διακριτική ικανότητα επιτυγχάνεται με την εκτύπωση επαφής. Στο Σχήμα 26 παρατηρείται η μεταβολή στην ένταση της ακτινοβολίας στην επιφάνεια του φωτοευαίσθητου υμενίου λόγω των φαινομένων περίθλασης που λαμβάνουν χώρα κατά την έκθεση με προβολή και με γειννίαση και συγκρίνονται με την ένταση της ακτινοβολίας στην επιφάνεια του φωτοευαίσθητου υμενίου όταν εφαρμόζεται εκτύπωση επαφής.



**Σχήμα 26.** Ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην επιφάνεια του φωτοευαίσθητου υμενίου για τα τρία συστήματα εκτύπωσης. Η απόσταση της μάσκας από το φωτοευαίσθητο υμένιο εξαρτάται από το σύστημα εκτύπωσης [126].

### 2.1.2. Πηγές έκθεσης που χρησιμοποιούνται στη φωτολιθογραφία

Η φωτολιθογραφία περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιείται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως πηγή έκθεσης. Όσο πιο μικρό είναι το μήκος κύματος της πηγής έκθεσης τόσο πιο μικρές δομές μπορούν να αποτυπωθούν στο υμένιο. Οι πιο γνωστές τεχνικές φωτολιθογραφίας είναι η λιθογραφία στο υπεριώδες (360-460 nm) (Ultraviolet, UV) και στο βαθύ υπεριώδες (248, 193, 157 nm) (Deep Ultraviolet, DUV) [123, 127].

Αρχικά η έκθεση των φωτοευαίσθητων υμενίων γινόταν σε λάμπες Hg. Οι λάμπες αυτές περιέχουν ατμούς Hg και δύο αγώγιμα ηλεκτρόδια. Κατά την εφαρμογή τάσης το αέριο ιονίζεται και δημιουργείται ένα πλάσμα, το οποίο περιέχει ιόντα, ηλεκτρόνια και ουδέτερα σωματίδια. Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια που εμπεριέχονται στα άτομα Hg μεταφέροντας σε αυτά την ενέργειά τους. Τα διεγερμένα άτομα Hg όταν επανέρχονται στη βασική τους κατάσταση εκπέμπουν φωτόνια. Οι ενέργειες των φωτονίων που εκπέμπονται εξαρτώνται από τις ενεργειακές στάθμες του Hg. Με τη χρήση φίλτρων απομονώνονται συνήθως δύο ταινίες εκπομπής, μία στα 436 nm (G-line) και μία στα 365 nm (I-line). Με συστήματα προβολής που χρησιμοποιούν πηγή έκθεσης στα 365 nm αποτυπώνονται δομές γύρω στα 0.35  $\mu\text{m}$  [123, 126].

Για την αποτύπωση δομών μικρότερων από 0.35  $\mu\text{m}$  χρησιμοποιούνται τα excimer lasers KrF, ArF, F<sub>2</sub> τα οποία εκπέμπουν στα 248 nm, 193 nm και στα 157 nm αντίστοιχα [123, 124, 126, 127]. Για να καλυφθούν οι απαιτήσεις της λιθογραφίας για ακόμα υψηλότερη διακριτική ικανότητα χρησιμοποιείται το ακραίο υπεριώδες. Η ακτινοβολία στο ακραίο υπεριώδες (Extreme Ultraviolet, EUV) (συνήθως 13 nm) παράγεται από σύγχροτρα, λέιζερ ελευθέρων ηλεκτρονίων και πλάσμα [123, 124].

## 2.2. Φωτοευαίσθητα λιθογραφικά υλικά που χρησιμοποιούνται στη φωτολιθογραφία

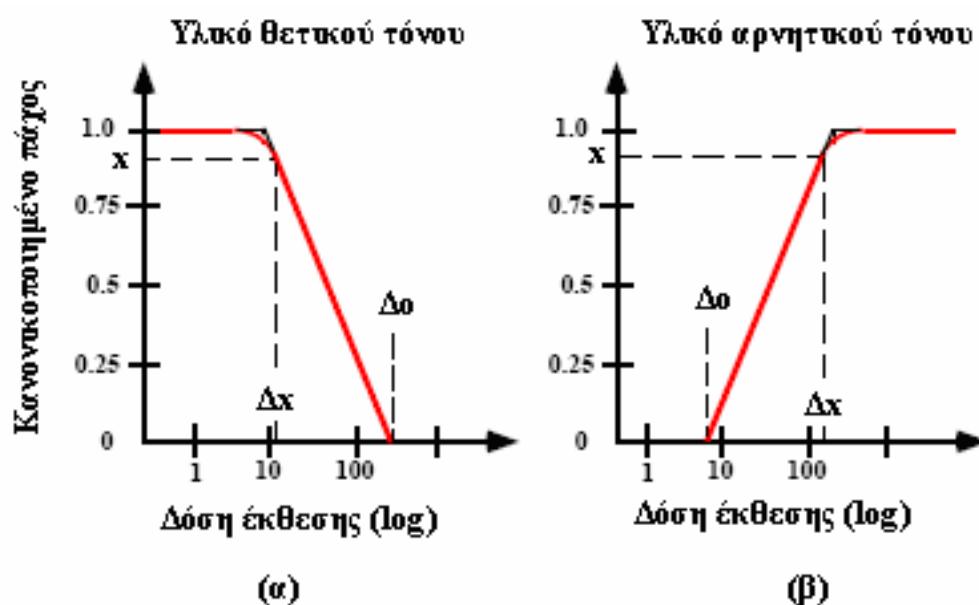
Τα φωτοευαίσθητα πολυμερικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται για την αποτύπωση σχήματος είναι αναγκαίο να εμφανίζουν μία σειρά από επιθυμητές ιδιότητες. Οι κυριότερες ιδιότητες που είναι απαραίτητο να πληρούν αυτά τα υλικά με βάση όλα τα στάδια της φωτολιθογραφίας που αναλύθηκαν στο Κεφάλαιο Α.2.1 είναι οι ακόλουθες [123, 128]:

1. Δυνατότητα σχηματισμού ομοιόμορφης επίστρωσης μέσω περιστροφής
2. Κατάλληλη απορρόφηση στο μήκος κύματος έκθεσης
3. Φωτοχημεία που οδηγεί σε αλλαγή διαλυτότητας
4. Αντίσταση στο μέσο εγχάραξης (αν πραγματοποιείται εγχάραξη) μετά τη φωτολιθογραφία
5. Διακριτική ικανότητα, δηλαδή ικανότητα αποτύπωσης μικρών διαστάσεων χωρίς παραμόρφωση
6. Ικανοποιητικές ανοχές διεργασίας

### 2.2.1. Χαρακτηριστικά μεγέθη των φωτοευαίσθητων πολυμερικών υμενίων

Τα βασικά μεγέθη χαρακτηρισμού των φωτοευαίσθητων πολυμερικών υμενίων είναι η αντίθεση, η ευαισθησία, η ανθεκτικότητα και η διακριτική ικανότητα.

Η αντίθεση αποτελεί ένδειξη της ικανότητας του πολυμερικού υμενίου να διαχωρίζει τις εκτεθειμένες από τις ανέκθετες περιοχές. Τα φαινόμενα περίθλασης, τα οποία παρατηρούνται στη φωτολιθογραφία έχουν ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή έκθεση περιοχών που βρίσκονται στα άκρα των διαφανών περιοχών της μάσκας, των λεγόμενων «γκρι» περιοχών (gray region), οι οποίες δημιουργούν πρόβλημα στη διακριτική ικανότητα της μεθόδου. Η διακριτική ικανότητα βελτιώνεται όταν το πολυμερικό υμένιο χαρακτηρίζεται από μεγάλη αντίθεση. Η αντίθεση προσδιορίζεται πειραματικά από μετρήσεις του πάχους του υμενίου για διάφορες δόσεις έκθεσης. Χαρακτηριστικές καμπύλες αντίθεσης για υλικά θετικού και αρνητικού τόνου παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα 27 [123, 126].



Σχήμα 27. Καμπύλες αντίθεσης φωτοπολυμερικών υλικών: (α) θετικού και (β) αρνητικού τόνου [126].

Όπως φαίνεται στο σχήμα οι καμπύλες αντίθεσης απεικονίζουν το κανονικοποιημένο πάχος δηλαδή το πάχος του υμενίου μετά την εμφάνιση διαιρεμένο με το αρχικό πάχος συναρτήσει του λογάριθμου της δόσης έκθεσης. Στα υλικά θετικού τόνου η πιο χρήσιμη τιμή χαρακτηρισμού της ευαισθησίας είναι η δόση καθαρισμού ( $\Delta_0$ ), στην οποία το υλικό γίνεται πλήρως διαλυτό. Επίσης, για τον προσδιορισμό των καμπύλων αντίθεσης απαραίτητες είναι οι δόσεις που προκαλούν μερική διαλυτοποίηση του υλικού ( $\Delta_x$ ), όπου  $x$  είναι το ποσοστό του υλικού που παραμένει αδιάλυτο. Στα υλικά αρνητικού τόνου χρήσιμες δόσεις είναι η δόση που καθιστά το υλικό εντελώς αδιάλυτο  $\Delta_{1,0}$  και η δόση που σηματοδοτεί την έναρξη αδιαλυτοποίησης του υλικού  $\Delta_0$  καθώς και οι δόσεις που προκαλούν σημαντική αδιαλυτοποίηση του υλικού όπως η  $\Delta_{0,7}$  και η  $\Delta_{0,9}$  [123, 128].

Η αντίθεση είναι η κλίση της καμπύλης και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\gamma = \frac{x}{\log \frac{\Delta_0}{\Delta_x}} \quad \text{για υλικά θετικού τόνου} \quad (5)$$

$$\gamma = \frac{x}{\log \frac{\Delta_x}{\Delta_0}} \quad \text{για υλικά αρνητικού τόνου} \quad (6)$$

Για την επίτευξη υψηλής διακριτικής ικανότητας είναι επιθυμητή μεγάλη τιμή αντίθεσης, δηλαδή απότομη αλλαγή της διαλυτότητας του υλικού. Επειδή η κλίση της καμπύλης αντίθεσης δεν είναι τις περισσότερες φορές σταθερή, η κλίση υπολογίζεται στο τμήμα της καμπύλης που αντιστοιχεί στα μικρότερα πάχη [123, 128]. Η τιμή της αντίθεσης  $\gamma$  δεν εξαρτάται μόνο από το υλικό αλλά επηρεάζεται από παραμέτρους της λιθογραφικής διεργασίας, για παράδειγμα εξαρτάται από τους χρόνους θέρμανσης, την πηγή έκθεσης, από το υπόστρωμα στο οποίο έχει εναποτεθεί το φωτοπολυμερικό υμένιο και από τη φυσικοχημεία του σταδίου της εμφάνισης.

Η ευαισθησία αποτελεί δείκτη της απαιτούμενης δόσης έκθεσης του υμενίου. Οι μονάδες μέτρησης της είναι  $\text{mJ cm}^{-2}$ . Όταν η ευαισθησία του υλικού είναι υψηλή τότε απαιτούνται μικρότεροι χρόνοι έκθεσης και αυξάνεται η απόδοση της μεθόδου. Όμως, πολύ υψηλές τιμές ευαισθησίας συνοδεύονται από δυσκολία ελέγχου της συμπεριφοράς του υλικού, καθώς, σε αυτήν την περίπτωση η αλλαγή της διαλυτότητας του υλικού συμβαίνει και σε σημεία τα οποία υφίστανται έκθεση μέσω περίθλασης της ακτινοβολίας. Συνήθως, είναι επιθυμητό η αντίθεση του υλικού να είναι υψηλή και η ευαισθησία να είναι χαμηλότερη [123, 126].

Η ανθεκτικότητα του υμενίου αφορά περισσότερο τις διεργασίες που ακολουθούν τη λιθογραφία. Συνήθως, στην κατασκευή ολοκληρωμένων κυκλωμάτων μετά τη λιθογραφία έπεται η διεργασία της ιοντικής εμφύτευσης ή της εγχάραξης [123, 126].

Η διακριτική ικανότητα, δηλαδή η ικανότητα αποτύπωσης μικρών διαστάσεων χωρίς παραμόρφωση, επηρεάζεται από το υλικό του υμενίου καθώς και από τα επιμέρους στάδια της διεργασίας (δόση έκθεσης, θέρμανση, εμφάνιση). Η σύσταση των φωτοπολυμερικών υμενίων και οι συνθήκες των επιμέρους σταδίων της λιθογραφικής διεργασίας μελετώνται έτσι ώστε να περιοριστούν όσο το δυνατό περισσότερο τα φαινόμενα περίθλασης και να επιτευχθεί η μέγιστη διακριτική ικανότητα [123, 126]. Όταν η διάσταση που πρόκειται να αποτυπωθεί είναι

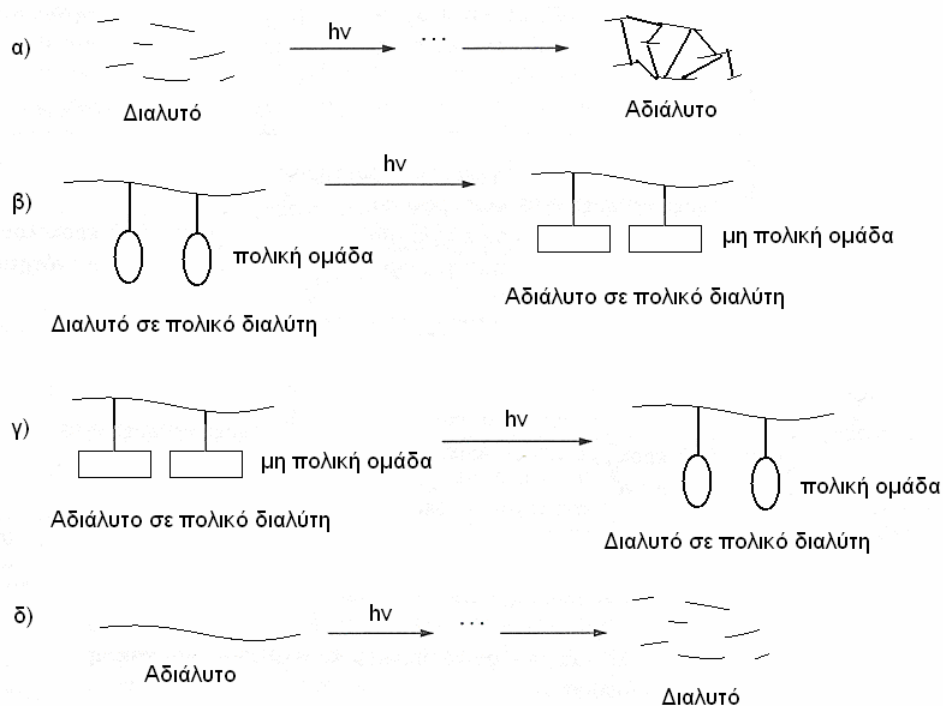
συγκρίσιμη με το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται τότε εντείνονται τα φαινόμενα περίθλασης. Γι' αυτό κάθε φορά που εισάγεται ένα νέο οπτικό σύστημα έκθεσης απαιτείται και η ανάπτυξη νέων πολυμερικών υλικών λιθογραφίας κατάλληλων για έκθεση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Οι απαραίτητες προδιαγραφές που πρέπει να καλύπτουν τα λιθογραφικά υλικά, ώστε να είναι κατάλληλα για έκθεση στη συγκεκριμένη περιοχή της ακτινοβολίας, είναι οι ακόλουθες:

1. Η τιμή της απορρόφησης της ακτινοβολίας να είναι τέτοια ώστε να εκτίθεται σχετικά ομοιόμορφα το υμένιο του πολυμερικού υλικού σε όλο το βάθος του. Συνήθως μια τιμή απορρόφησης 0.3-0.4 είναι επιθυμητή.
2. Να υπάρχει δυνατότητα για φωτοχημικές αντιδράσεις που οδηγούν σε αλλαγή διαλυτότητας [128].

Στη συνέχεια για την επίτευξη της μέγιστης διακριτικής ικανότητας απαιτείται βελτιστοποίηση των συνθηκών έκθεσης και θέρμανσης μετά την έκθεση, οι οποίες καθορίζουν την κινητική των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα και βελτιστοποίηση των συνθηκών εμφάνισης.

### 2.2.2. Μηχανισμοί αλλαγής διαλυτότητας

Οι μηχανισμοί αλλαγής διαλυτότητας μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων παρουσιάζονται στο Σχήμα 28. Η αλλαγή στη διαλυτότητα πραγματοποιείται είτε μέσω δημιουργίας σταυροδεσμών ανάμεσα στις πολυμερικές αλυσίδες (Σχήμα 28 α) είτε μέσω της αλλαγής διαλυτότητας μιας πολυμερικής αλυσίδας στο διάλυμα του εμφανιστή (Σχήμα 28 β, γ) είτε μέσω διάσπασης της πολυμερικής αλυσίδας (Σχήμα 28 δ) [128]. Ένα παράδειγμα πολυμερικών υμενίων στα οποία η αλλαγή διαλυτότητας στηρίζεται στη δημιουργία σταυροδεσμών είναι υλικά που περιέχουν αζίδια ως φωτοχημικά ενεργούς διασταυρωτές [129]. Ένα παράδειγμα φωτοπολυμερικού υμενίου στο οποίο η αλλαγή διαλυτότητας επέρχεται μέσω φωτοδιάσπασης της βασικής του αλυσίδας αποτελεί ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) [130].



Σχήμα 28. Μηχανισμοί αλλαγής διαλυτότητας [128].

### 2.2.3. Συστατικά φωτοευαίσθητων υμενίων

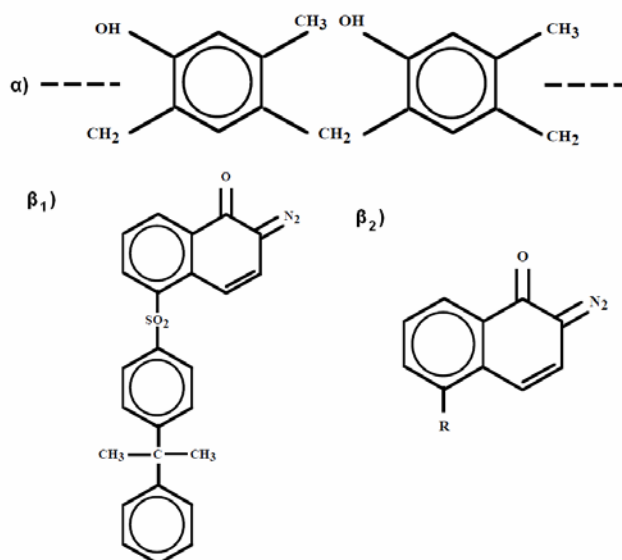
Τα φωτοευαίσθητα υλικά που αξιοποιούνται σε διεργασίες αποτύπωσης σχήματος κατά την έκθεση τους σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος υφίστανται χημικές μεταβολές που οδηγούν σε αλλαγή διαλυτότητας. Τα φωτοευαίσθητα υλικά βασίζονται συνήθως σε πολυμερή [126]. Το πολυμερές εκτός από τη δυνατότητα αλλαγής διαλυτότητας παρέχει και τη δυνατότητα δημιουργίας ομοιόμορφων επιστρώσεων. Η συντριπτική πλειοψηφία των υλικών λιθογραφίας είναι συστήματα δύο ή περισσότερων συστατικών, στα οποία εκτός από το πολυμερές περιλαμβάνονται ειδικά πρόσθετα, τα οποία ελέγχουν συγκεκριμένες ιδιότητες και φωτοευαίσθητοποιητές, οι οποίοι απορροφούν στην περιοχή έκθεσης και ενεργοποιούν μέσω κατάλληλων φωτοχημικών ή και θερμικών αντιδράσεων τις χημικά δραστικές ομάδες του πολυμερούς [126, 128].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως κάθε φορά που εισάγεται μία νέα πηγή έκθεσης απαιτείται και η ανάπτυξη νέων πολυμερικών υλικών λιθογραφίας κατάλληλων για έκθεση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, καθώς τα υλικά που είναι κατάλληλα για έκθεση σε ένα μήκος κύματος απορροφούν πάρα πολύ ή καθόλου σε κάποιο άλλο. Για παράδειγμα υλικά τα οποία είναι κατάλληλα για έκθεση στα 365 nm παρουσιάζουν μεγάλη απορρόφηση στα 248 nm, η οποία υπερβαίνει τις επιθυμητές τιμές απορρόφησης που προαναφέρθηκαν (0.3-0.4) [123]. Στη συνέχεια αναλύονται φωτοευαίσθητα λιθογραφικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως.

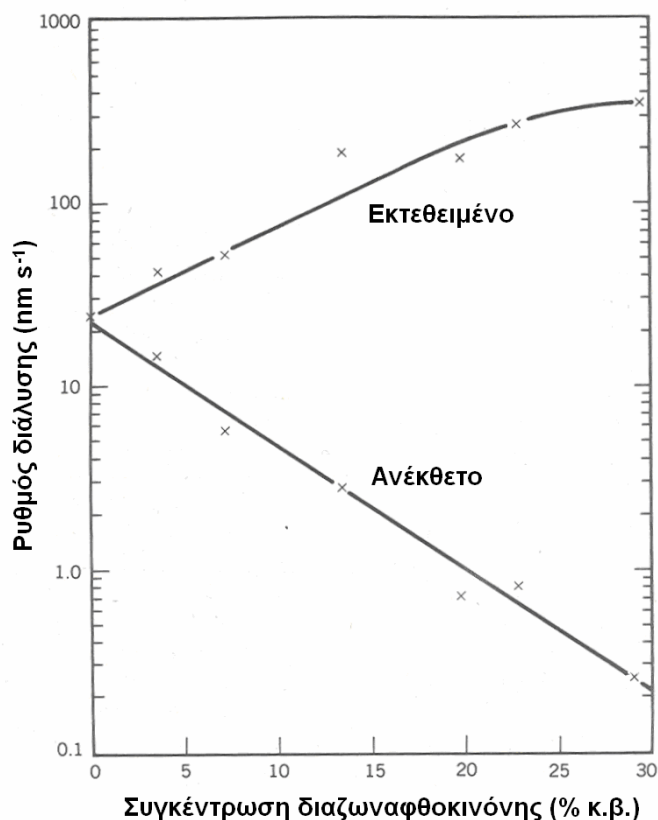
#### 2.2.3.1. Φωτοευαίσθητα λιθογραφικά υλικά

##### 2.2.3.1.1. Φωτοευαίσθητα λιθογραφικά υλικά που στηρίζονται στις διαζωναφθοκινόνες

Τα υλικά αυτά αποτελούνται από φαινολικές ρητίνες και διαζωναφθοκινόνες. Η φαινολική ρητίνη είναι συνήθως νεολάκα. Οι νεολάκες είναι προϊόντα που παράγονται κατά την πολυσυμπύκνωση φαινόλης (ή παραγώγων της) με φορμαλδεΰδη, με τη φορμαλδεΰδη σε υπερστοιχειομετρική αναλογία και παρουσία οξέος [131]. Οι συντακτικοί τύποι ενός συνήθους τύπου φωτοευαίσθητου λιθογραφικού υλικού νεολάκας-διαζωναφθοκινόνης παρουσιάζονται στο Σχήμα 29 [126].



Σχήμα 29. α) Συντακτικός τύπος συνήθους νεολάκας, β<sub>1</sub>) Συντακτικός τύπος συγκεκριμένης διαζωναφθοκινόνης και β<sub>2</sub>) Γενικός συντακτικός τύπος διαζωναφθοκινόνης [126].

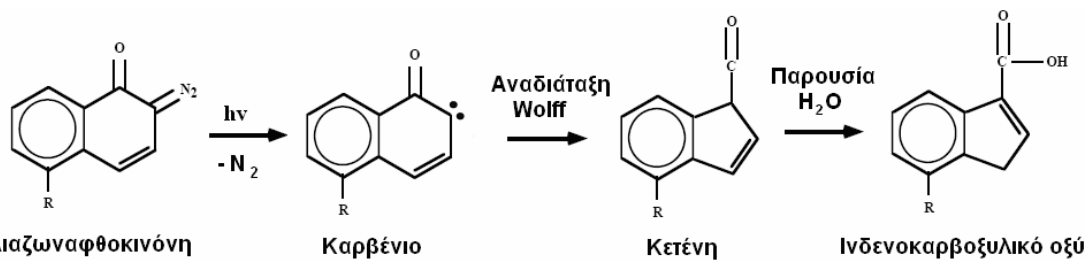


**Σχήμα 30.** Διαλυτότητα του ανέκθετου και του εκτεθειμένου πολυμερούς νεολάκας-διαζωναφθοκινόνης [132].

Οι φαινολικές ρητίνες είναι διαλυτές σε αραιά αλκαλικά υδατικά διαλύματα, αλλά κατά την προσθήκη ενός παραγώγου διαζωναφθοκινόνης ο ρυθμός διάλυσής τους μειώνεται. Η μη ιοντισμένη υδρόφοβη διαζωναφθοκινόνη παρεμποδίζει τη διάλυση. Όταν η διαζωναφθοκινόνη εκτεθεί σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος τότε μετατρέπεται σε ινδενοκαρβοξυλικό οξύ, το οποίο είναι διαλυτό σε αλκαλικά υδατικά διαλύματα και αυξάνει το ρυθμό διάλυσης της φαινολικής ρητίνης. Πρακτικά, όταν επιστρώνεται ένα υμένιο νεολάκας που περιέχει 20% κ.β. διαζωναφθοκινόνη και πραγματοποιείται έκθεση μέσω μάσκας και στη συνέχεια το υμένιο εμφανίζεται σε αλκαλικό διάλυμα, οι εκτεθειμένες περιοχές θα διαλυθούν 200 φορές περίπου πιο γρήγορα από τις ανέκθετες περιοχές (Σχήμα 30). Πρέπει να διευκρινιστεί ότι ο ρυθμός διάλυσης των ανέκθετων περιοχών δεν είναι μηδενικός και γι' αυτό η εμφάνιση του υμενίου πρέπει να σταματήσει όταν διαλυθούν οι εκτεθειμένες περιοχές για να κατασκευαστεί τελικά ένα σχηματοποιημένο υμένιο [132].

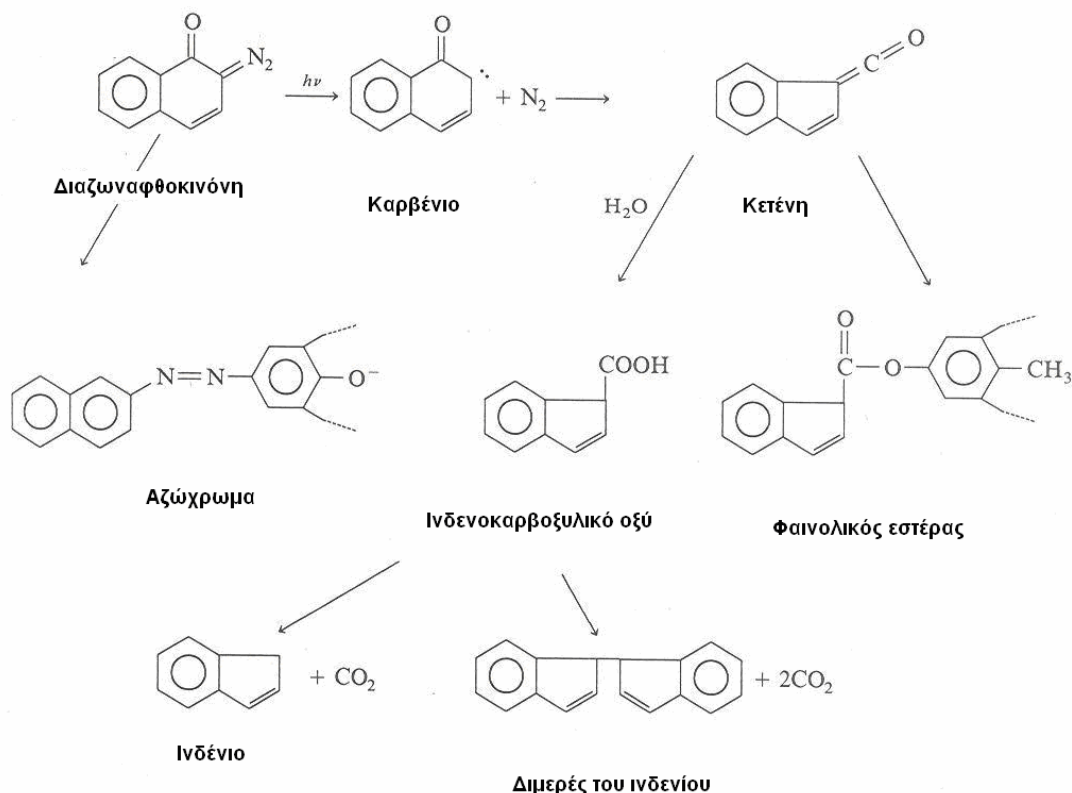
Η ενέργεια από την ακτινοβολία που προσπίπτει στο μόριο της διαζωναφθοκινόνης σπάει το δεσμό με τον οποίο είναι προσδεμένο στο μόριο το N<sub>2</sub> και σχηματίζεται ένα καρβένιο. Στη συνέχεια το μόριο αναδιατάσσεται μετακινώντας ένα άτομο C εκτός δακτυλίου στον οποίο προσδένεται ομοιοπολικά το O (αναδιάταξη Wolff). Στη συνέχεια η κετένη μετατρέπεται σε ινδενοκαρβοξυλικό οξύ παρουσία H<sub>2</sub>O. Το ινδενοκαρβοξυλικό οξύ διαλύεται σε βασικό διάλυμα εμφανιστή (Σχήμα 31) [126].





**Σχήμα 31.** Φωτοχημική αλλαγή διαλυτότητας, με σχηματισμό υδρόφιλης ομάδας του φωτοευαισθητοποιητή διαζωναφθοκινόνη. Υλικό θετικού τόνου [126].

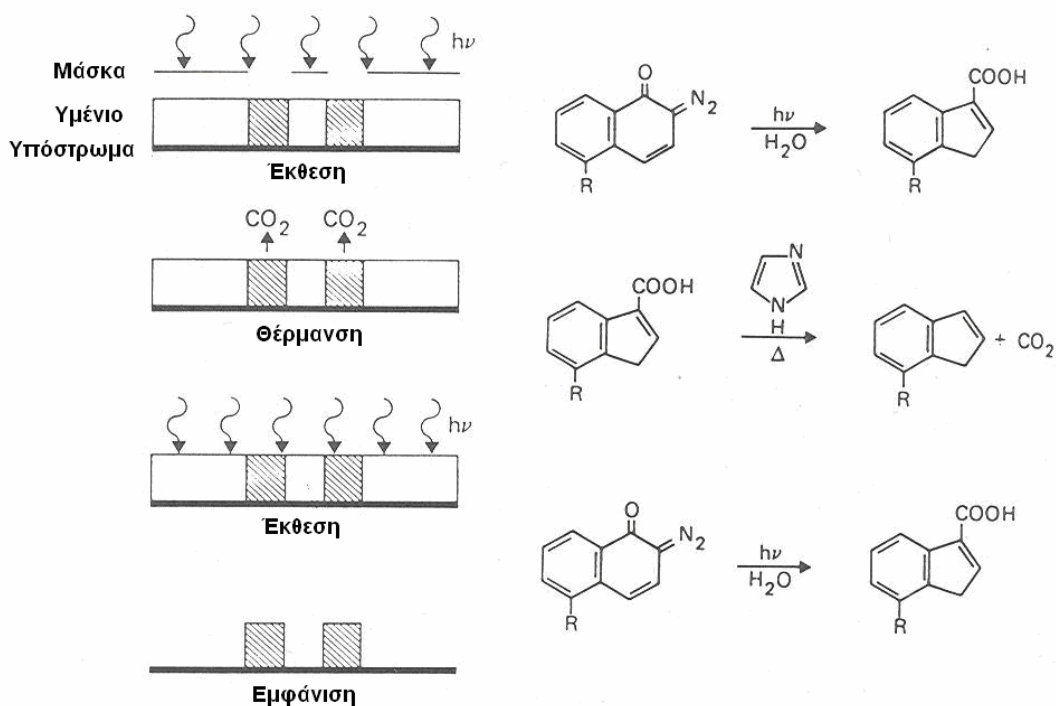
Αν δεν υπάρχει η κατάλληλη ποσότητα νερού, η κετένη μπορεί να αντιδράσει απευθείας με τη ρητίνη και να παραχθούν ανεπιθύμητοι σταυροδεσμοί στις εκτεθειμένες περιοχές. Για να αποφευχθεί αυτή η δικτύωση προστίθενται στη ρητίνη αμίνες, που δρουν ως δεσμευτές (scavengers) αντιδρώντας με την κετένη, αλλά αυτές μπορούν να υποβάλλουν και το οξύ σε περαιτέρω υδρόλυση. Μία άλλη ανεπιθύμητη αντίδραση που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της εμφάνισης στις ανέκθετες περιοχές είναι η αντίδραση της διαζωναφθοκινόνης με τη ρητίνη που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αζωχρώματος (azo dye) (Σχήμα 32) [132].



**Σχήμα 32.** Ανεπιθύμητες αντιδράσεις της διαζωναφθοκινόνης [132].

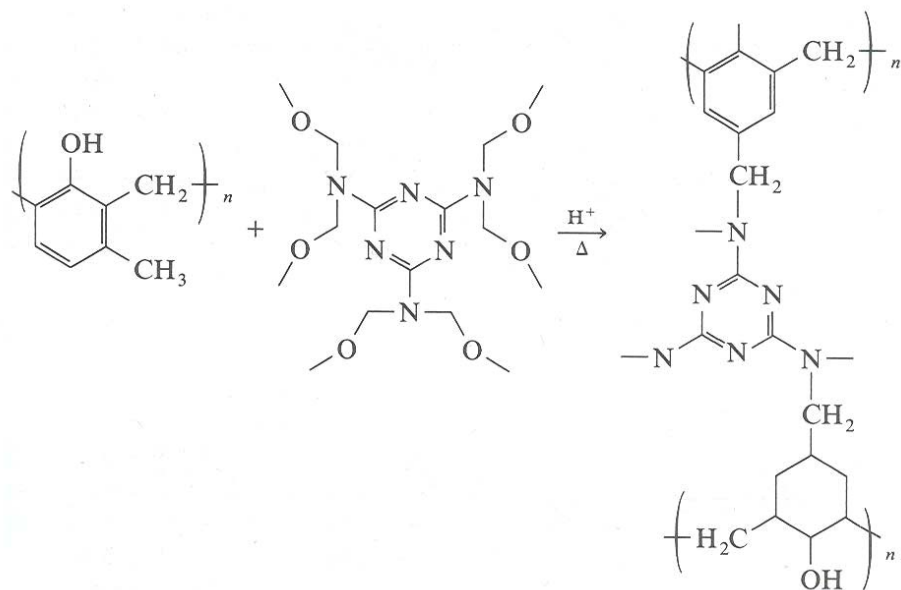
Μία αντίδραση που συμβαίνει μετά την έκθεση αν το υμένιο θερμανθεί είναι η αποκαρβοξυλίωση (decarboxylation) του ινδενοκαρβοξυλικού οξέος προς ινδένιο ή διμερές του ινδενίου. Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιείται για να αποτυπώσει δομές αρνητικού τόνου (Σχήμα 33). Η αποκαρβοξυλίωση καταλύεται από βάσεις και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες αν προστεθεί μία ισχυρή βάση στο υμένιο. Οι βάσεις ιμιδαζόλιο (imidazole), μοναζολίνη (monazoline) και τριαιθανολαμίνη (triethanolamine) δίνουν αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα, όπως και η κατεργασία με ατμούς αμμωνίας. Επομένως, η διεργασία για να παραχθούν δομές

αρνητικού τόνου σε ρητίνη νεολάκας-διαζωναφθοκινόνης διαφοροποιείται σε σχέση με αυτήν που πραγματοποιείται για να παραχθούν δομές θετικού τόνου ως προς ένα επιπλέον στάδιο έκθεσης, το οποίο ακολουθείται από θέρμανση έτσι ώστε το ινδονοκαρβοξυλικό οξύ να μετατραπεί σε ινδένιο [132].



Σχήμα 33. Λιθογραφία αρνητικού τόνου της νεολάκας-διαζωναφθοκινόνης παρουσία βάσης [132].

Επίσης είναι δυνατή η διασταύρωση του υμενίου νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης προσθέτοντας μελαμίνη σαν διασταυρωτή. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα σε αυτήν την περίπτωση καταλύεται παρουσία οξέος σε υψηλές θερμοκρασίες και παρουσιάζεται στο Σχήμα 34 [132].

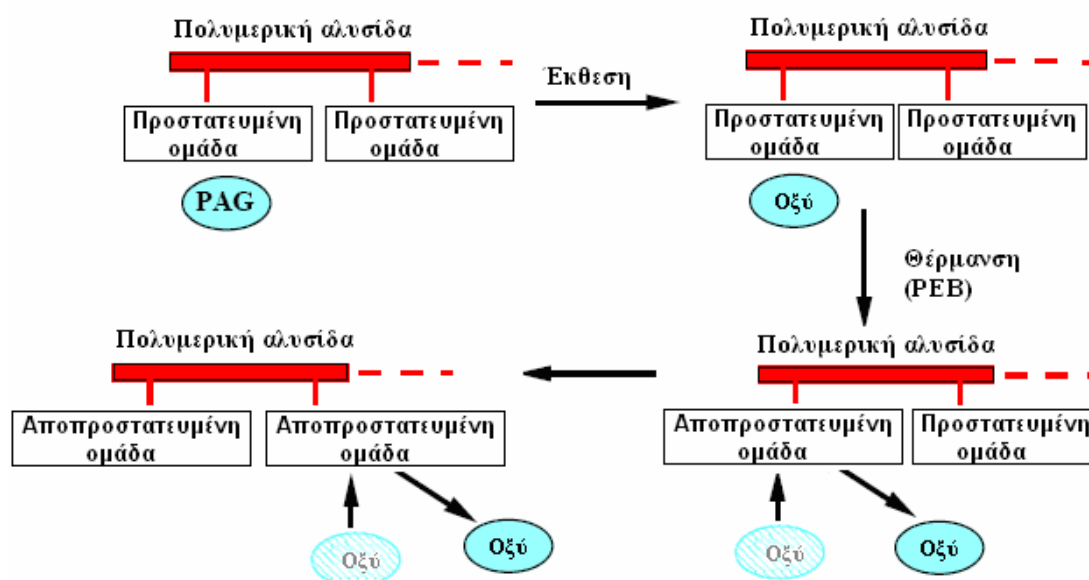


Σχήμα 34. Διασταύρωση της νεολάκας με τη μελαμίνη παρουσία οξέος σε υψηλές θερμοκρασίες [132].

### 2.2.3.1.2. Υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης

Τα υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης είναι μεγάλης ευαισθησίας υλικά και στηρίζονται στη δημιουργία οξέος μετά από έκθεση ενός φωτο-παραγωγού οξέος (Photo-Acid Generator, PAG), ο οποίος υπάρχει στο φωτοευαίσθητο υλικό. Στη συνέχεια το φωτο-παραγόμενο οξύ κατά τη διάρκεια της θέρμανσης του υμενίου καταλύει αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν σε αλλαγή της διαλυτότητας του υλικού (Σχήμα 35) [126]. Στα υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης η χημική αλλαγή πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια, το στάδιο της φωτο-ευαισθητοποίησης του υμενίου και το στάδιο της αλλαγής διαλυτότητας [123, 124]. Επομένως, η αλλαγή διαλυτότητας καθορίζεται από πολλούς παράγοντες όπως από την κινητική των αντιδράσεων αποπροστασίας, τη θερμοκρασία και το χρόνο θέρμανσης και από εξωτερικούς παράγοντες όπως τυχόν μόλυνση του υμενίου η οποία παρεμποδίζει την αντίδραση του οξέος με το πολυμερές ή τυχόν εξάτμιση του παραγόμενου οξέος [123, 124].

Η χημεία αυτή εφαρμόζεται σε υλικά θετικού και αρνητικού τόνου. Στα υλικά θετικού τόνου η πολυμερική αλυσίδα φέρει προστατευμένες ομάδες (Σχήμα 35). Στη συνέχεια το οξύ καταλύει τη διάσπαση των υδρόφοβων αυτών προστατευμένων ομάδων και οδηγεί για παράδειγμα στην αποπροστασία υδροξυλικών ή καρβοξυλικών ομάδων ενώ ταυτόχρονα αναγεννιέται το μόριο του οξέος. Η αποπροστασία όξινων υδροξυλικών ομάδων έχει ως επακόλουθο τη διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε υδατικό διάλυμα βάσης [123, 128]. Πολύ σημαντικό στάδιο της διεργασίας όπως προαναφέρθηκε αποτελεί η θέρμανση που πραγματοποιείται μετά την έκθεση (Post Exposure Bake, PEB). Η θέρμανση αυτή παρέχει την ενέργεια για τη διάχυση των μορίων του οξέος καθώς και την ενέργεια για την υλοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του οξέος και κατάλληλων ομάδων του πολυμερούς. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητος καθώς η εξάρτηση της διάχυσης και της ταχύτητας της αντίδρασης από τη θερμοκρασία είναι εκθετική [123, 126].



Σχήμα 35. Βασική αρχή υλικών χημικής ενίσχυσης θετικού τόνου [126].

Τα φωτοευαίσθητα υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης παρουσιάζουν υψηλές ευαισθησίες, καθώς οι απαιτούμενες δόσεις έκθεσης είναι περίπου  $20\text{-}30 \text{ mJ/cm}^2$

[123, 124]. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ορισμένες πολύ χαμηλές απαιτούμενες δόσεις έκθεσης, γύρω στο  $1 \text{ mJ/cm}^2$ , γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη του φωτο-παραγωγού οξέος, ο οποίος μπορεί με πολύ χαμηλή δόση να παράγει επαρκή ποσότητα οξέος η οποία στη συνέχεια μπορεί να προκαλέσει την επιθυμητή αλλαγή διαλυτότητας [123, 124, 133]. Αυτό πηγάζει από το γεγονός ότι ένα μόριο οξέος μπορεί να ενεργοποιήσει μεγάλο αριθμό αντιδράσεων που οδηγούν στην αλλαγή της διαλυτότητας, αλλά αυτό εξαρτάται και από το μηχανισμό αλλαγής διαλυτότητας, δηλαδή πόσες πλευρικές ομάδες αντιδρούν με το οξύ και πόσο εύκολα. Επίσης, υλικά της κατηγορίας αυτής εκπληρώνουν το σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκαν, δηλαδή μπορούν να αποτυπώσουν πολύ μικρές δομές. Η διακριτική ικανότητα των υλικών, εξαρτάται από το μήκος κύματος, από παράγοντες που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του οξέος με το φωτοευαίσθητο υμένιο, οι οποίοι προαναφέρθηκαν και επηρεάζουν την κινητική των αντιδράσεων αποπροστασίας (θερμοκρασία, χρόνος θέρμανσης) [123, 124] και από τη συμπεριφορά τους κατά το στάδιο της εμφάνισης.

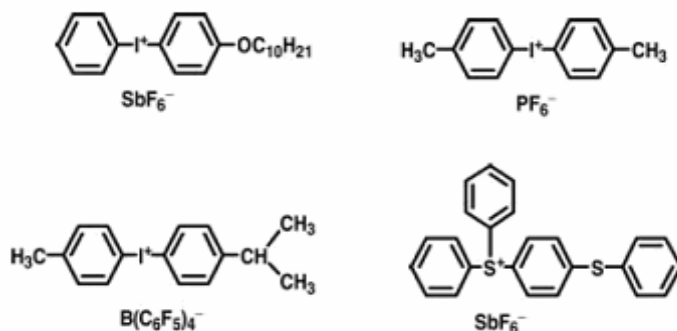
Τα προβλήματα αυτής της τεχνολογίας σχετίζονται με τον έλεγχο της δράσης του φωτο-παραγόμενου οξέος, καθώς, το οξύ μπορεί να διαχυθεί σε περιοχές οι οποίες πρέπει να παραμείνουν αμετάβλητες (ανέκθετες περιοχές). Το πρόβλημα γίνεται πιο έντονο όταν οι δομές που πρέπει να αποτυπωθούν στο υμένιο είναι πολύ μικρές [123, 124]. Ένα άλλο πρόβλημα είναι η ύπαρξη ουσιών οι οποίες δεσμεύουν το φωτο-παραγόμενο οξύ πριν τη διάχυσή του στο υμένιο. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι ασθενώς βασικές ουσίες, για παράδειγμα η Ν-μεθυλο-πυρρολιδόνη (N-methyl-pyrrolidone). Οι ουσίες αυτές αντιδρούν με το φωτο-παραγόμενο οξύ παρεμποδίζοντας την αντίδρασή του με το φωτοευαίσθητο υμένιο [123, 134]. Οι λύσεις που προτείνονται σε αυτό το πρόβλημα είναι η τροποποίηση της σύνθεσης του υμενίου, έτσι ώστε να είναι λιγότερο επιρρεπές στην προσρόφιση ουσιών [135] ή ο σχηματισμός ενός επιφανειακού στρώματος, το οποίο θα προστατεύει το υμένιο [126]. Επίσης, μια άλλη λύση στο πρόβλημα είναι η χρήση φίλτρων, για τον καθαρισμό της ατμόσφαιρας του χώρου στον οποίο διεξάγεται η διεργασία [123, 126, 135]. Τέλος προσθήκη μικρής ποσότητας βάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των φαινομένων διάχυσης του οξέος.

#### **2.2.3.1.2.1. Φωτοπαραγωγοί οξέος**

Οι φωτοπαραγωγοί οξέος είναι ουσίες, οι οποίες κατά την έκθεσή τους σε κατάλληλο μήκος κύματος παράγουν οξύ, το οποίο καταλύει ή εκκινεί αντιδράσεις που οδηγούν σε αλλαγή της διαλυτότητας του υλικού. Οι φωτοπαραγωγοί οξέος πρέπει να πληρούν τις παρακάτω προδιαγραφές [123, 124, 136]:

1. Να έχουν κατάλληλο συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας,  $\epsilon$ , στο μήκος κύματος που γίνεται η έκθεση.
2. Να έχουν υψηλή κβαντική απόδοση ως προς την παραγωγή οξέος.
3. Να είναι συμβατοί με τη μήτρα στην οποία διασπείρονται ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα διαχωρισμού φάσεων.
4. Να παρουσιάζουν θερμική σταθερότητα.

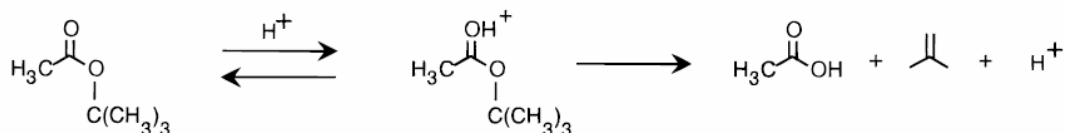
Οι πιο αντιπροσωπευτικές ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως φωτοπαραγωγοί οξέος, είναι τα άλατα σουλφονίου ή ιωδονίου [137, 138]. Παραδείγματα φωτοπαραγωγών οξέων παρουσιάζονται στο Σχήμα 36.



**Σχήμα 36.** Συντακτικοί τύποι αλάτων ιωδονίου και σουλφονίου. Τα άλατα αυτά χρησιμοποιούνται ως φωτοπαραγωγό οξέος [138].

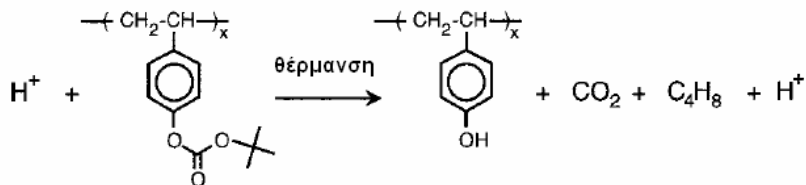
Ορισμένες ιδιότητες του φωτο-παραγωγού οξέος αποδίδονται στο ανιόν, ενώ ορισμένες άλλες ιδιότητες αποδίδονται στο κατιόν από τα οποία απαρτίζεται. Το κατιόν ελέγχει τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη θεμελιώδη θερμική σταθερότητα και με την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως είναι η φωτο-ευαισθησία και η κβαντική απόδοση. Η θερμική σταθερότητα σχετίζεται με την αποφυγή ανεπιθύμητων θερμικών αντιδράσεων του φωτο-παραγωγού οξέος. Το ανιόν σχετίζεται με την ισχύ του οξέος που παράγεται από τη φωτόλυση. Για παράδειγμα τα διφαινυλο άλατα ιωδονίου που έχουν σαν ανιόντα τα  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{AsF}_6^-$   $\text{SbF}_6^-$  παράγουν υπεροξεία με οξύτητες Hammet ( $H_0$ ) της τάξης από -15 έως ~ -30 [136]. Η φωτοχημεία αυτών των ενώσεων έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα [139, 140, 141].

Ένα παράδειγμα υλικού χημικής ενίσχυσης θετικού τόνου δίνεται στο Σχήμα 37, στο οποίο φαίνεται η επίδραση του μορίου του οξέος και ο τελικός σχηματισμός υδρόφιλης ομάδας [123, 124, 142].



**Σχήμα 37.** Παράδειγμα υλικού χημικής ενίσχυσης θετικού τόνου [124].

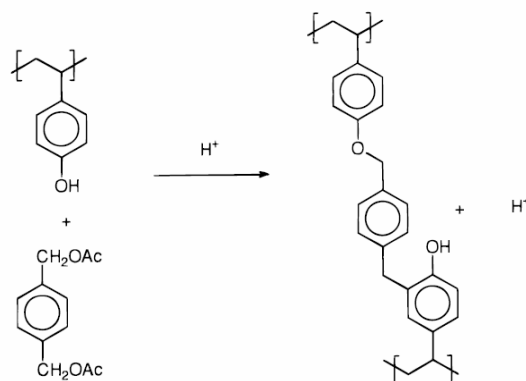
Ένα ευρέως διαδεδομένο υλικό μηχανισμού χημικής ενίσχυσης είναι το πολυ (τριτοταγές-βουτοξυκαρβονυλοξυστυρένιο) (poly(tert-butoxycarbonyloxystyrene), PT-BOCST). Στο Σχήμα 38 φαίνεται η αντίδραση αποπροστασίας του υδροξυλίου του πολυμερούς, η οποία καταλύεται από μόριο οξέος [123, 124, 143].



**Σχήμα 38.** Μηχανισμός αντίδρασης αποπροστασίας του υδροξυλίου του πολυμερούς PT-BOCST [124].

Στα υλικά αρνητικού τόνου ο φωτοπαραγωγός οξέος καταλύει αντιδράσεις διασταύρωσης, μετατρέποντας το πολυμερές σε αδιάλυτο. Παράδειγμα υλικού χημικής ενίσχυσης αρνητικού τόνου δίνεται στο Σχήμα 39, στο οποίο απεικονίζεται η

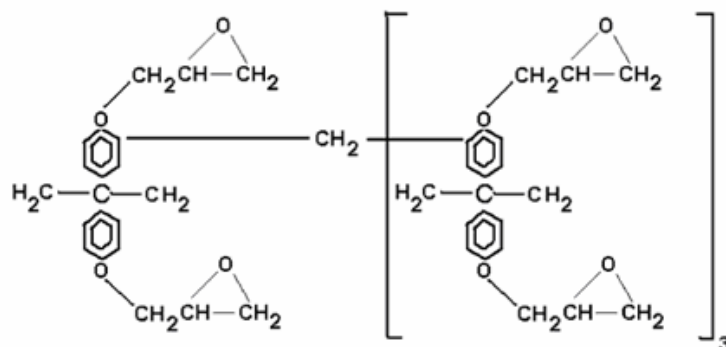
αντίδραση του πολυ(υδροξυστυρενίου) με ένα διασταυρωτή, η οποία καταλύεται από μόριο οξέος [123, 124, 144].



Σχήμα 39. Παράδειγμα υλικού χημικής ενίσχυσης αρνητικού τόνου [124].

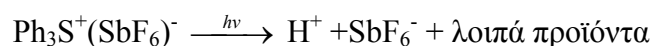
### 2.2.3.1.2.2. Εποξειδικές ρητίνες

Ένα διαδεδομένο υλικό μηχανισμού χημικής ενίσχυσης είναι η εποξειδική ρητίνη γλυκιδικός αιθέρας της διφαινόλης A (glycidyl ether of bisphenol A), γνωστή με την εμπορική ονομασία SU-8. Η SU-8 (Σχήμα 40) έχει οκτώ εποξειδικές ομάδες σε κάθε μονομερές [145].



Σχήμα 40. Μονομερές της εποξειδικής ρητίνης SU-8 [145].

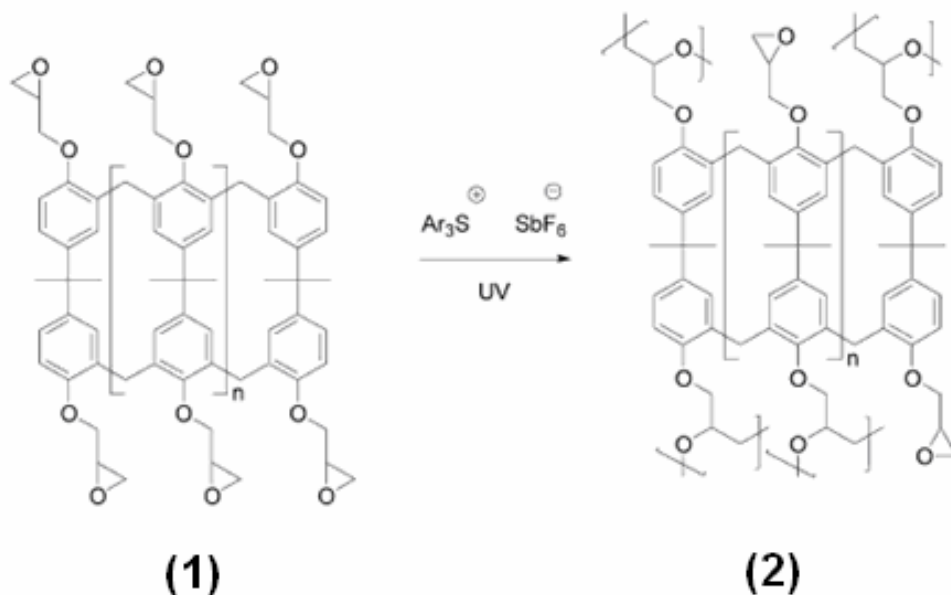
Ο φωτο-παραγωγός οξέος που συνήθως περιέχει το φωτοευαίσθητο υλικό είναι το εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου,  $\text{Ph}_3\text{S}^+(\text{SbF}_6)^-$ . Το εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου με έκθεση στο UV παράγει ένα ισχυρό οξύ σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



Το ισχυρό αυτό οξύ εκκινεί τον κατιοντικό πολυμερισμό της SU-8, ο οποίος προκαλεί τη δικτύωση του πολυμερούς στις εκτεθειμένες περιοχές με αποτέλεσμα τη δημιουργία δομών αρνητικού τόνου (Σχήμα 41) [146, 147].

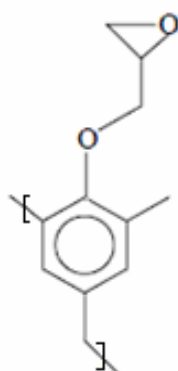
Ο μηχανισμός πολυμερισμού της SU-8 είναι περίπλοκος. Γενικά ο πολυμερισμός της SU-8 επιταχύνεται από τη θέρμανση που πραγματοποιείται μετά την έκθεση (PEB) στους 80-100 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τη διάχυση του φωτο-παραγόμενου οξέος και την κινητικότητα των μονομερών της SU-8. Ο γρήγορος πολυμερισμός κατά τη διάρκεια του PEB περιορίζει τη διάχυση του φωτο-παραγόμενου οξέος στις ανέκθετες περιοχές λόγω του εγκλωβισμού των πρωτονίων ή και της χημικής δέσμευσής τους στο πολυμερές. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται

φαινόμενο κλωβού (cage effect) και εξασφαλίζει την υψηλή διακριτική ικανότητα του υλικού. Ταυτόχρονα, ο πολυμερισμός επιβραδύνεται κατά τη διάρκεια του ΡΕΒ λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης των εποξειδικών δακτυλίων που δεν έχουν αντιδράσει και της μειωμένης κινητικότητας των μονομερών λόγω της αύξησης του φαινομένου κλωβού [146].



**Σχήμα 41.** Πολυμερισμός της SU-8: 1) Μακρομονομέρες της SU-8, 2) Ρητίνη υψηλής διασταύρωσης [147].

Εκτός από την SU-8 και άλλα εποξειδικά πολυμερή έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία που δρουν με παρόμοιο τρόπο [148]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα πολυμερές εποξειδωμένης νεολάκας (Σχήμα 42). Το πολυμερές εποξειδωμένης νεολάκας χρησιμοποιήθηκε για να παρασκευαστεί φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο εποξειδικής ρητίνης το οποίο περιείχε το εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου ως φωτοευαισθητοποιητή.



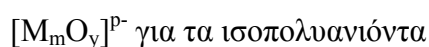
**Σχήμα 42.** Πολυμερές εποξειδωμένης νεολάκας.

### 2.2.3.1.3. Οι πολυοξομεταλλικές ενώσεις ως φωτοοξειδωτές και φωτοευαισθητοποιητές σε λιθογραφικά υλικά

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή για τη φωτοχημική τροποποίηση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (Polyvinyl alcohol, PVA) χρησιμοποιήθηκαν πολυοξομεταλλικές ενώσεις ως φωτοευαισθητοποιητές. Η φωτοχημική τροποποίηση

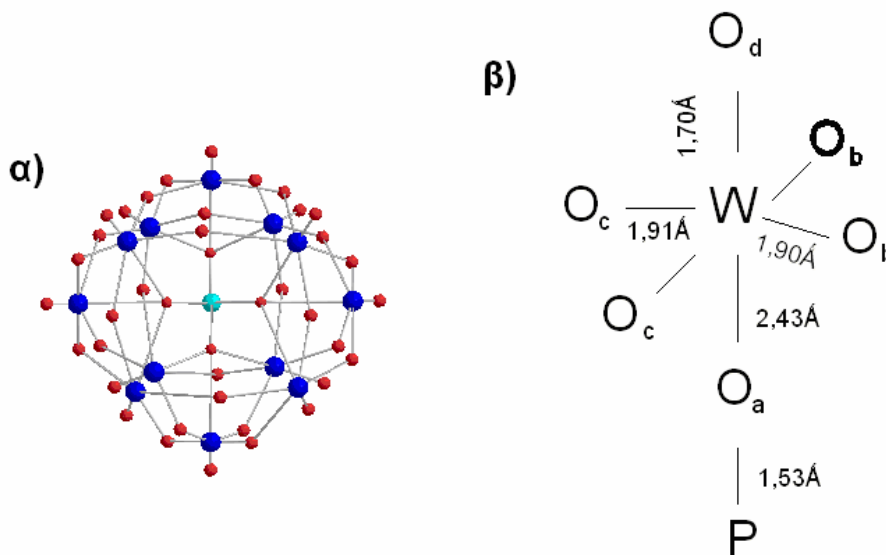
της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) είχε αναπτυχθεί για να εφαρμοστεί σε μικροηλεκτρονικές διατάξεις [149, 150]. Για τη φωτοχημική τροποποίηση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) χρησιμοποιήθηκε η φωτοευαίσθητη πολυοξομεταλλική ένωση (ΠΟΜ) 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ). Η επιτυχία της μεθόδου στηριζόταν στην ύπαρξη του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος στην πολυμερική μήτρα. Το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ανθίσταται στην εγχάραξη με πλάσμα οξυγόνου, καθώς τα οξειδία του βολφραμίου δεν είναι πτητικά, ενώ τα φθορίδια, τα οξοφθορίδια και τα οξοχλωρίδια του βολφραμίου είναι πτητικά. Επομένως, όταν πραγματοποιηθεί η μεταφορά του σχήματος μέσω φωτολιθογραφίας το φωτοευαίσθητο υμένιο μπορεί να απομακρυνθεί με πλάσμα που περιέχει φθόριο ή χλώριο [149].

Οι πολυοξομεταλλικές ενώσεις είναι μοριακές ενώσεις ανάλογες με τα οξειδία μετάλλων, οι οποίες είναι ευδιάλυτες στο νερό και σε πολλούς οργανικούς διαλύτες. Ο γενικός τύπος των ανιόντων των ενώσεων αυτών είναι:



Το Μ συνήθως είναι μολυβδαίνιο ή βολφράμιο. Τα μέταλλα αυτά βρίσκονται στις υψηλότερες οξειδωτικές τους καταστάσεις. Το ετεροάτομο Χ μπορεί να είναι οποιοδήποτε στοιχείο του περιοδικού πίνακα εκτός από τα ευγενή αέρια. Ο λόγος Χ:Μ χρησιμοποιείται συνήθως για να καταταγούν τα ετεροπολυανιόντα σε σειρές. Οι κυριότερες καλύτερα μελετημένες σειρές είναι οι 1:12, 2:18, 1:6 και 1:9 [151, 152].

Οι πολυοξομεταλλικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως φωτοευαίσθητοποιητές στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή είναι το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) και το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ( $(NH_4)_6(P_2W_{18}O_{62})$ ).



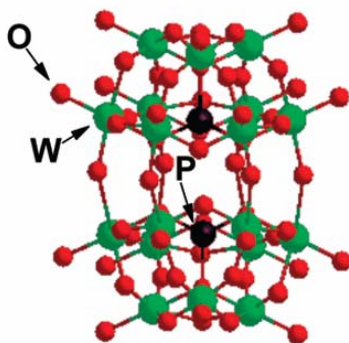
**Σχήμα 43.** α) Δομή Keggin του 12-βολφραμοφωσφορικού ανιόντος  $PW_{12}O_{40}^{3-}$ . β) Δομή ενός οκταέδρου  $WO_6$  ενωμένο με το κεντρικό ετεροάτομο του P [152, 153].

Η δομή του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος προσδιορίστηκε από τον Keggin με περίθλαση ακτίνων Χ. Η δομή αυτή είναι γνωστή σαν δομή Keggin. Στη δομή Keggin στο κέντρο βρίσκεται το ετεροάτομο του φωσφόρου το οποίο ενώνεται με



τέσσερα οξυγόνα (Σχήμα 43 α). Κάθε ένα από αυτά τα οξυγόνα περιστοιχίζονται από τρία οκτάεδρα  $WO_6$ . Στο κέντρο του κάθε οκτάεδρου βρίσκεται το άτομο του W. Συνολικά, δηλαδή το άτομο του P περιστοιχίζεται από δώδεκα οκτάεδρα. Στο σχήμα 43 β δίνεται η δομή ενός οκτάεδρου  $WO_6$ , το οποίο είναι ενωμένο με το κεντρικό ετεροάτομο του P [151-154].

Το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο δεν παρουσιάζει την ίδια δομή με το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ, καθώς το ανιόν του ανήκει στα ετεροπολυανιόντα της σειράς 2:18, για τα οποία η βασική δομή είναι η δομή που ο Dawson προσδιόρισε στον κρύσταλλο του 18-βολφραμοδιφωσφορικού καλίου με περίθλαση ακτίνων X. Η δομή Dawson προκύπτει από τη δομή Keggin αν από ένα ανιόν Keggin αφαιρεθούν τρία γειτονικά οκτάεδρα  $M_3O_{13}$  που έχουν κοινές κορυφές με αποτέλεσμα να μένει η μισή μονάδα  $XM_9O_{34}$ . Δύο μισές μονάδες ενώνονται μοιράζοντας τα ελεύθερα άτομα που προέκυψαν και τα οποία βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο συμμετρίας του όλου ανιόντος, ενώ τα δύο ετεροάτομα X δεν ενώνονται μεταξύ τους μέσω κοινού οξυγόνου. Ο Dawson απέδειξε ότι τα ετεροπολυανιόντα 2:18 έχουν ελλειψοειδές σχήμα με άξονες 1.2 nm και 1.7 nm. Στο Σχήμα 44 δίνεται η δομή Dawson του 18-βολφραμοδιφωσφορικού ανιόντος [151, 152, 155].

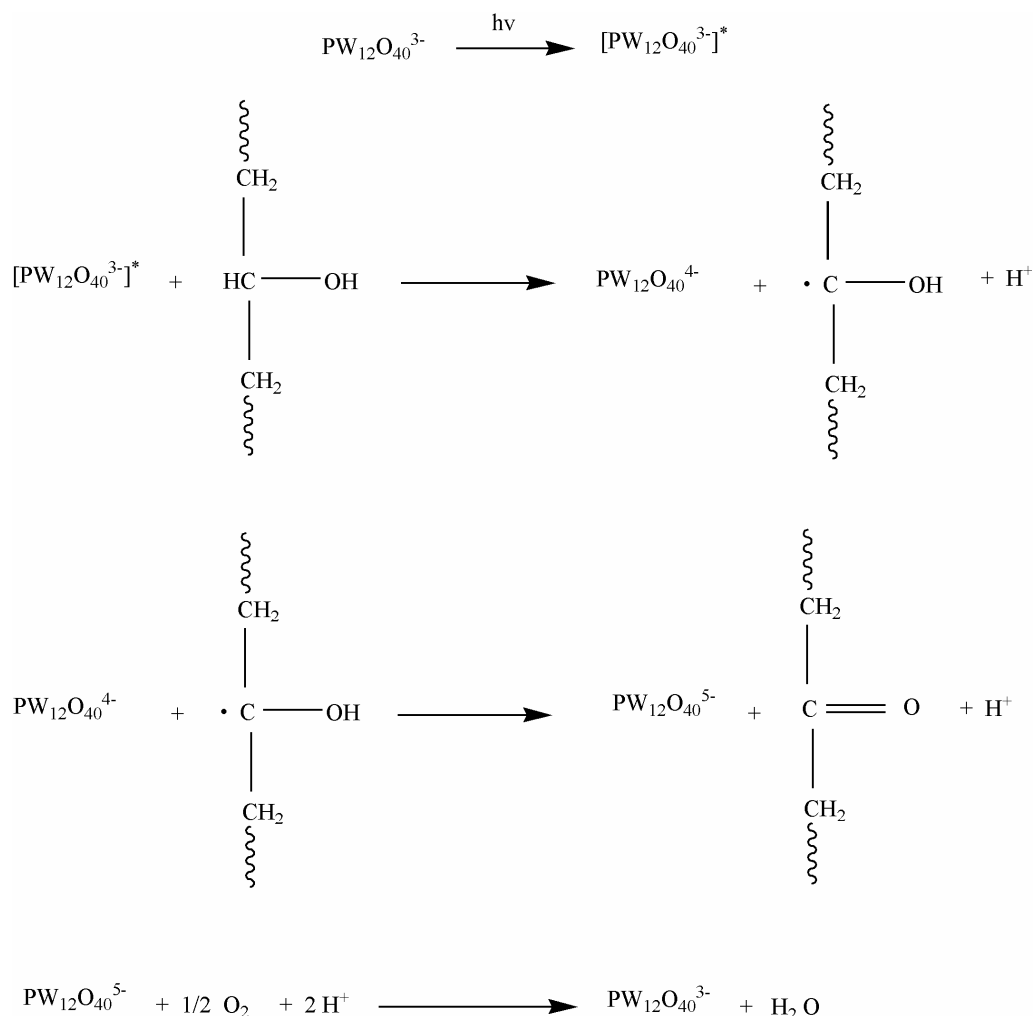


**Σχήμα 44.** Δομή Dawson του 18-βολφραμοδιφωσφορικού ανιόντος  $P_2W_{18}O_{62}^{6-}$  [155].

Οι πολυοξομεταλλικές ενώσεις (POM) χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διατριβή λόγω των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν μετά από έκθεση σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος. Η δυνατότητα φωτοοξειδοαναγωγικών αντιδράσεων των POM τις καθιστά εργαλεία για τις τεχνικές αποτύπωσης σχήματος. Αναλυτικότερα με την απορρόφηση του φωτός από την POM προκαλείται ηλεκτρονική διέγερση με αποτέλεσμα την αναδιάταξη στην ηλεκτρονική διαμόρφωση του μορίου και ταυτόχρονα την ελάττωση του δυναμικού ιοντισμού και την αύξηση της ηλεκτρονικής συγγένειας της POM. Ουσιαστικά, με την απορρόφηση της ακτινοβολίας πραγματοποιείται μετάπτωση του ηλεκτρονίου από το υψηλότερο κατειλημμένο δεσμικό τροχιακό στο χαμηλότερο μη κατειλημμένο αντιδεσμικό τροχιακό δημιουργώντας ένα κενό στο υψηλότερο δεσμικό τροχιακό. Η διεγερμένη κατάσταση της POM,  $POM^*$  είναι ισχυρότερο οξειδωτικό σε σχέση με τη μη διεγερμένη κατάσταση (βασική κατάσταση), γιατί στη διεγερμένη κατάσταση το μόριο της POM μπορεί να δεχτεί ένα ηλεκτρόνιο στο κενό που υπάρχει στο υψηλότερο δεσμικό τροχιακό [156].

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φωτοοξειδοαναγωγικής αντίδρασης μίας POM με μία οργανική ένωση είναι η αντίδραση του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) με την PVA (Σχήμα 45) [149]. Αναλυτικότερα, αρχικά με έκθεση σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος προκαλείται η φωτοδιέγερση του 12-βολφραμοφωσφορικού ανιόντος  $PW_{12}O_{40}^{3-}$ . Στη συνέχεια το διεγερμένο ανιόν

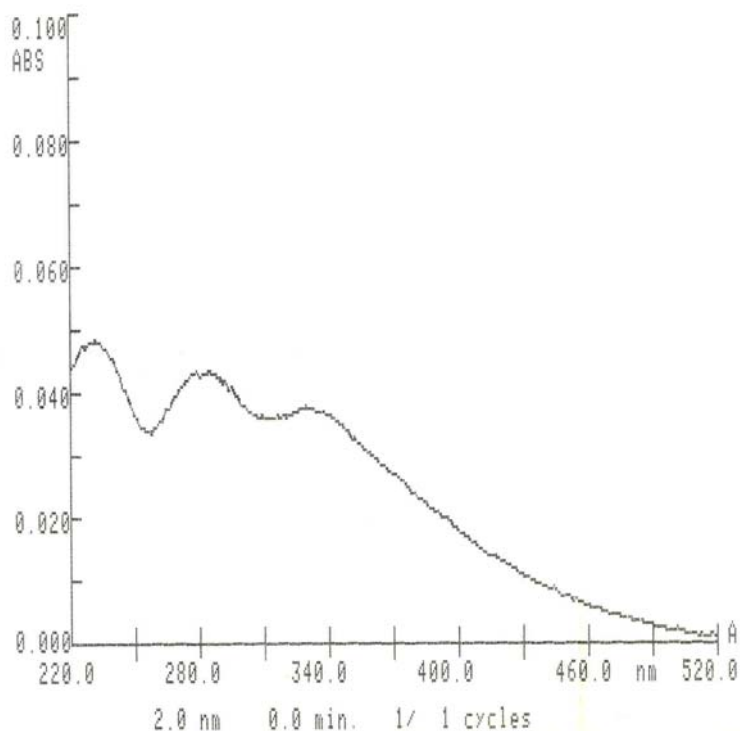
$[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}]^*$  ανάγεται προς  $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{4-}$  και  $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{5-}$ , ενώ ταυτόχρονα οξειδώνονται οι υδροξυλομάδες ( $-\text{OH}$ ) της PVA προς καρβονυλομάδες. Τέλος παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου το ανηγμένο 12-βολφραμοφωσφορικό ανιόν,  $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{5-}$ , επανοξειδώνεται στο αρχικό  $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ . Επίσης το διεγερμένο ανιόν  $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}]^*$  μπορεί να αποδιεγερθεί απελευθερώνοντας θερμότητα και να μην οδηγήσει σε οξείδωση της PVA [152].



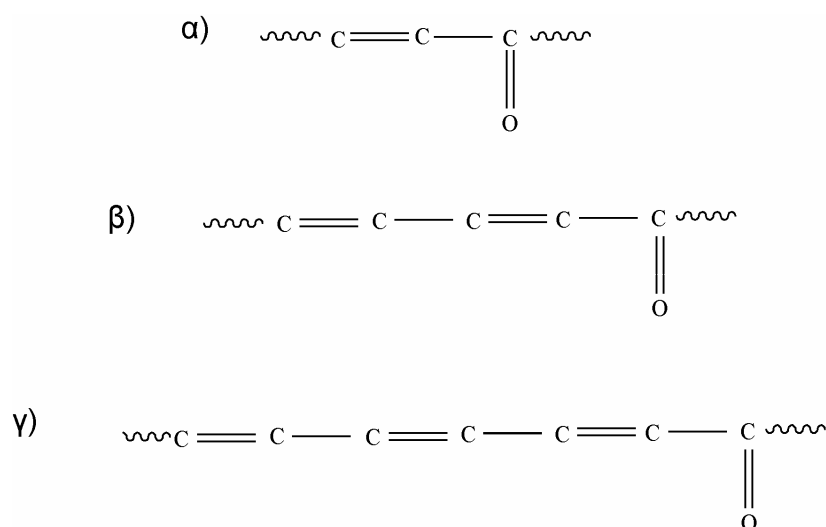
**Σχήμα 45.** Φωτοαναγωγή του 12-βολφραμοφωσφορικού ανιόντος και οξείδωση της PVA με αποτέλεσμα το σχηματισμό καρβονυλομάδων [149].

Στη συνέχεια, η αντίδραση που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 45 μπορεί να οδηγήσει στη διασταύρωση της PVA. Αναλυτικότερα σε υψηλές θερμοκρασίες και σε όξινο περιβάλλον λαμβάνει χώρα αφυδάτωση στις αλυσίδες της PVA που έχουν δημιουργηθεί καρβονυλομάδες παράγοντας διένια και διενόφιλα. Η παρουσία διενίων και συζυγιακών διενίων επιβεβαιώνεται από τα φάσματα UV-Vis (Σχήμα 46 και 47) όπου παρατηρείται ο σχηματισμός κορυφών απορρόφησης στα 230 nm, 280 nm και 330 nm. Το διένιο  $-\text{C}=\text{C}-$  απορροφά στα 170 nm (μετάβαση  $\pi \rightarrow \pi^*$ ), το  $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$  απορροφά στα 220 nm (μετάβαση  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) και το  $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$  απορροφά στα 260 nm (μετάβαση  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Οι κορυφές αυτές έχουν μετατοπιστεί σε μεγαλύτερα μήκη κύματος λόγω της παρουσίας της καρβονυλομάδας, δηλαδή απορροφούν στα 230 nm, 280 nm και 330 nm αντίστοιχα. Στα 280 nm απορροφά και η καρβονυλομάδα (μετάβαση  $n \rightarrow \pi^*$ ) [157, 158]. Στο τέλος, τα διένια με τα διενόφιλα

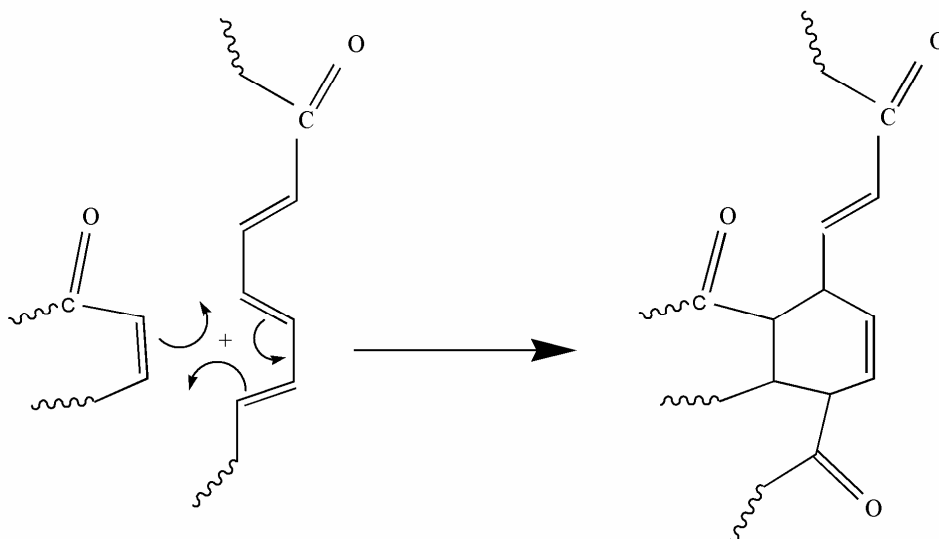
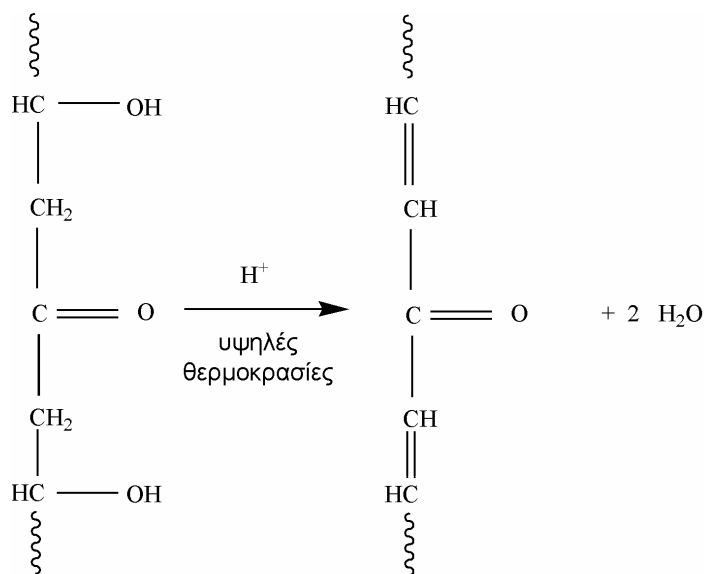
ενώνονται μέσω αντιδράσεων κυκλοπροσθήκης Diels Alder, με αποτέλεσμα τη διασταύρωση της PVA (Σχήμα 48) [149, 152]. Η κυκλοπροσθήκη Diels Alder πραγματοποιείται ταχύτατα και σε υψηλές αποδόσεις, επειδή το διενόφιλο διαθέτει έναν υποκαταστάτη που έλκει τα ηλεκτρόνια [68], καθώς ο διπλός δεσμός έχει σχηματιστεί κοντά στην καρβonyλομάδα ( $-C=O$ ), της οποίας ο άνθρακας είναι θετικά φορτισμένος με αποτέλεσμα να έλκει τα ηλεκτρόνια του διπλού δεσμού.



**Σχήμα 46.** Φάσμα απορρόφησης για υμένιο PVA που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ. Παρατηρούνται κορυφές στα 230 nm, 280 nm και 330 nm. Οι κορυφές αυτές παρατηρούνται λόγω του σχηματισμού διενίων και συζυγιακών διενίων. Στα 280 nm απορροφά και η καρβonyλομάδα [149].



**Σχήμα 47.** Διένια τα οποία απορροφούν στις κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα UV-Vis (Σχήμα 46) λόγω των μεταβάσεων  $\pi \rightarrow \pi^*$  στα: (α) 230 nm, (β) 280 nm και (γ) 330 nm. Στα 280 nm απορροφά και η καρβonyλομάδα  $-C=O$  λόγω της μετάβασης  $n \rightarrow \pi^*$ .



**Σχήμα 48.** Αντιδράσεις αφυδάτωσης και κυκλοπροσθήκης Diels-Alder που οδηγούν στη διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) μετά το σχηματισμό καρβονυλομάδων, που έχουν προκύψει από τη φωτοχημική αντίδραση της PVA με την πολυοξομεταλλική ένωση  $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$  [149].

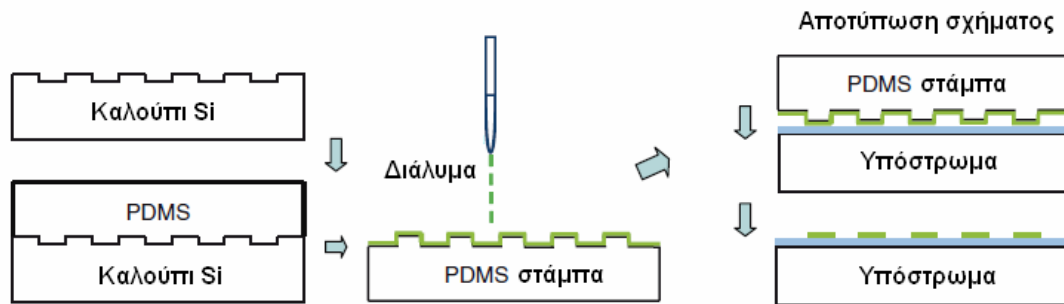
### 2.3. Εναλλακτικές τεχνικές λιθογραφίας

Η φωτολιθογραφία είναι η πιο εδραιωμένη τεχνολογία, αλλά δεν είναι η μοναδική επιλογή για την αποτύπωση σχήματος. Πλήθος τεχνικών λιθογραφίας, που δεν στηρίζονται στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, έχουν αναπτυχθεί. Για παράδειγμα στις τεχνικές λιθογραφίας με χρήση καλουπιών χρησιμοποιείται ένα αποτύπωμα για τη μεταφορά του επιθυμητού υλικού (εγγραφή με μικροεπαφή) ή για τη μεταφορά του επιθυμητού σχήματος (λιθογραφία νανοαποτυπώματος). Επίσης οι ακίδες σάρωσης χρησιμοποιούνται για την τοπική τροποποίηση των επιφανειών.

#### 2.3.1. Εγγραφή με μικροεπαφή

Στην τεχνική της εγγραφής με μικροεπαφή (Microcontact printing,  $\mu\text{CP}$ ) χρησιμοποιείται μία στάμπα από πολυ(διμεθυλο σιλοξάνη) (Poly(dimethyl siloxane)),

PDMS), η οποία εμποτίζεται σε κατάλληλο διάλυμα. Η στάμπα έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα με αποτέλεσμα αυτό να τροποποιείται τοπικά (Σχήμα 49).



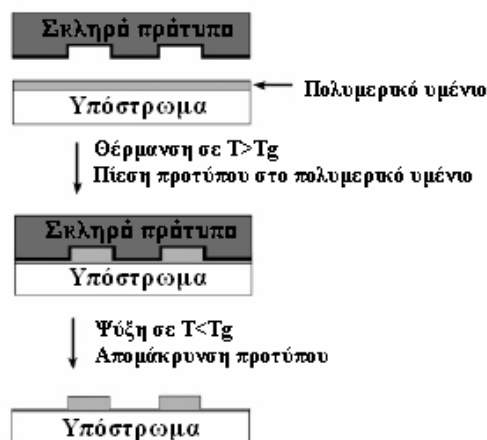
**Σχήμα 49.** Εγγραφή με μικροεπαφή: μεταφορά σχήματος στη στάμπα PDMS από καλούπι Si, τροποποίηση της στάμπας PDMS από το διάλυμα, μεταφορά του διαλύματος στο υπόστρωμα [159].

Η εγγραφή με μικροεπαφή ονομάζεται και εύπλαστη λιθογραφία επειδή οι μάσκες που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως από PDMS [160]. Η εγγραφή με μικροεπαφή μπορεί να εφαρμοστεί στην τροποποίηση μη επίπεδων επιφανειών π.χ. κυρτών, κοίλων επιφανειών. Επίσης είναι γρήγορη μέθοδος, η επιφάνεια τροποποιείται κατά την επαφή με τη στάμπα σε λιγότερο από 1 sec. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία ευθυγράμμισης της στάμπας λόγω της ελαστικότητας της [126, 127].

Η εγγραφή με μικροεπαφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτύπωση σχημάτων σε ανισόπεδα υποστρώματα, σε ασυνήθιστα υλικά και σε μεγάλες επιφάνειες και εφαρμόζεται συνήθως στην κατασκευή αισθητήρων, μικροαναλυτικών συσκευών, μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (MEMS) και στην οπτική [123, 127].

### 2.3.2. Λιθογραφία νανοαποτυπώματος

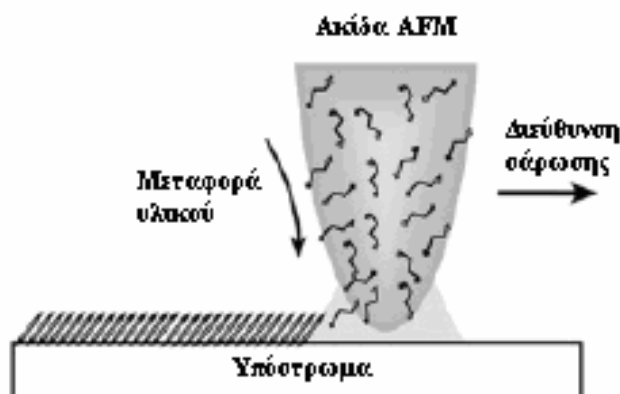
Στη λιθογραφία νανοαποτυπώματος χρησιμοποιείται ως καλούπι ένα σκληρό υλικό όπως είναι το πυρίτιο. Το καλούπι αυτό αποτυπώνει τη δομή του μέσω εφαρμογής πίεσης σε ένα θερμοπλαστικό πολυμερικό υμένιο, το οποίο θερμαίνεται σε θερμοκρασία πάνω από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (glass transition temperature,  $T_g$ ). Στη συνέχεια το καλούπι απομακρύνεται αφού το υμένιο ψυχθεί σε θερμοκρασία μικρότερη από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Σχήμα 50) [123, 161].



**Σχήμα 50.** Διάταξη λιθογραφίας νανοαποτυπώματος [161].

### 2.3.3. Λιθογραφία με ακίδες σάρωσης

Η ικανότητα των ακίδων σάρωσης στην απεικόνιση και τροποποίηση επιφανειών με τη διακριτική ικανότητα ατόμου τις καθιστά πολύτιμα εργαλεία για την παρασκευή νανοδομών. Μία εφαρμογή της μεθόδου φαίνεται στο Σχήμα 51, το οποίο απεικονίζει τη μεταφορά ενός ΑΜΣ σε μια επιφάνεια με χρήση της ακίδας του Μικροσκοπίου Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscope, AFM) [161].



Σχήμα 51. Εναπόθεση υλικού στην επιφάνεια με ακίδα σάρωσης AFM [161].

Η λιθογραφία με ακίδες σάρωσης δεν χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της χαμηλής ταχύτητας σάρωσης της επιφάνειας. Για την αύξηση της ταχύτητας της μεθόδου είναι δυνατή η χρήση παράλληλων διατάξεων ακίδων, αλλά αυξάνεται αρκετά το κόστος και η πολυπλοκότητα της μεθόδου [161].

## 3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

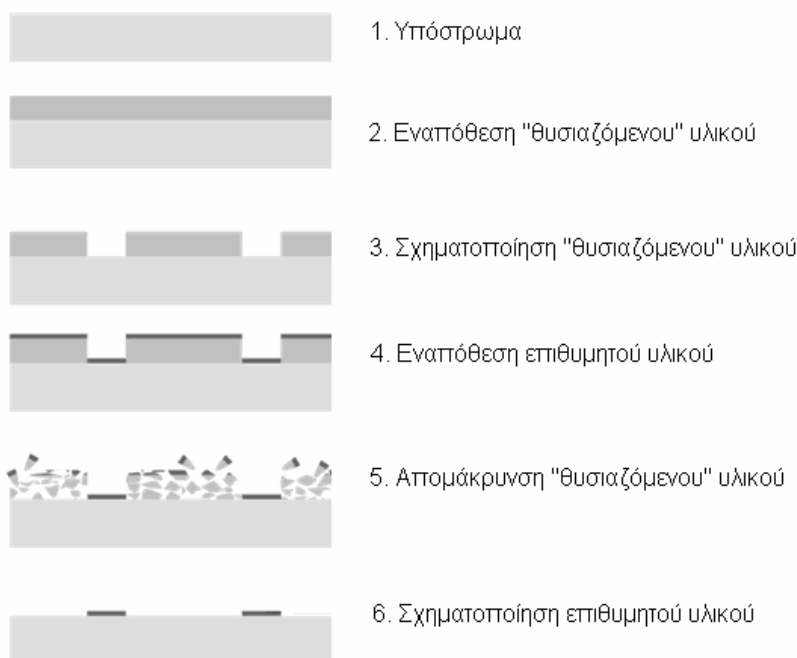
Η σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί μέσω των τεχνικών τροποποίησης των στερεών επιφανειών που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο Α.1 σε συνδυασμό με τις τεχνικές λιθογραφίας που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο Α.2. Στη συνέχεια του κεφαλαίου παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα σχηματοποίησης βιομορίων και κυττάρων μέσω φωτοκαθοδηγούμενων μεθόδων, μέσω εγγραφής με μικροεπαφή, μέσω λιθογραφίας νανοαποτυπώματος και μέσω λιθογραφίας με ακίδες σάρωσης.

### 3.1. Σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων μέσω φωτοκαθοδηγούμενων μεθόδων

Η πρώτη τεχνική που εφαρμόστηκε από τους MacAlear και Wehrung το 1978 [162, 163] για τη σχηματοποίηση ενός υποκείμενου στρώματος πρωτεΐνης ήταν η φωτολιθογραφία. Ο στόχος τους ήταν η ενσωμάτωση μίας πρωτεΐνης σε ένα βιο-μικροκύκλωμα. Η φωτολιθογραφία είναι μία τεχνική με την οποία μπορεί να επιτευχθεί υψηλή διακριτική ικανότητα και είναι εφικτή η σχηματοποίηση μεγάλης επιφάνειας σε μικρό χρονικό διάστημα. Προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή διακριτική ικανότητα συνήθως απαιτείται περιβάλλον καθαρού χώρου και το κόστος είναι υψηλό. Πολλές διεργασίες για τη σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων βασίζονται σε φωτοκαθοδηγούμενες μεθόδους, μερικές από τις οποίες παρουσιάζονται στα επόμενα κεφάλαια.

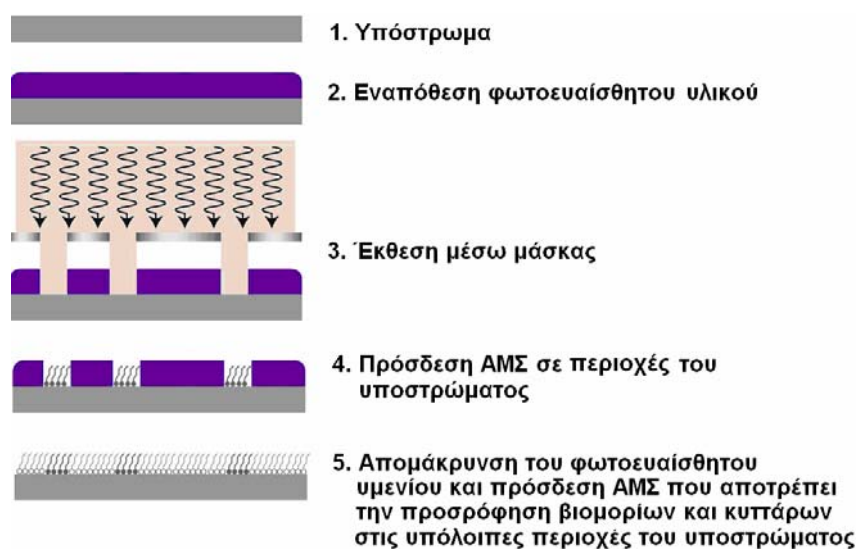
### 3.1.1. Η τεχνική της αποκόλλησης

Για τη σχηματοποίηση πολλών υλικών, προκειμένου να επιτευχθεί η επιλεκτική πρόσδεση βιομορίων και κυττάρων χρησιμοποιείται η τεχνική της αποκόλλησης (lift-off). Η φωτολιθογραφική διεργασία της αποκόλλησης (lift-off) εφαρμόζεται στη Μικροηλεκτρονική και περιλαμβάνει τα στάδια που παρουσιάζονται στο Σχήμα 52.



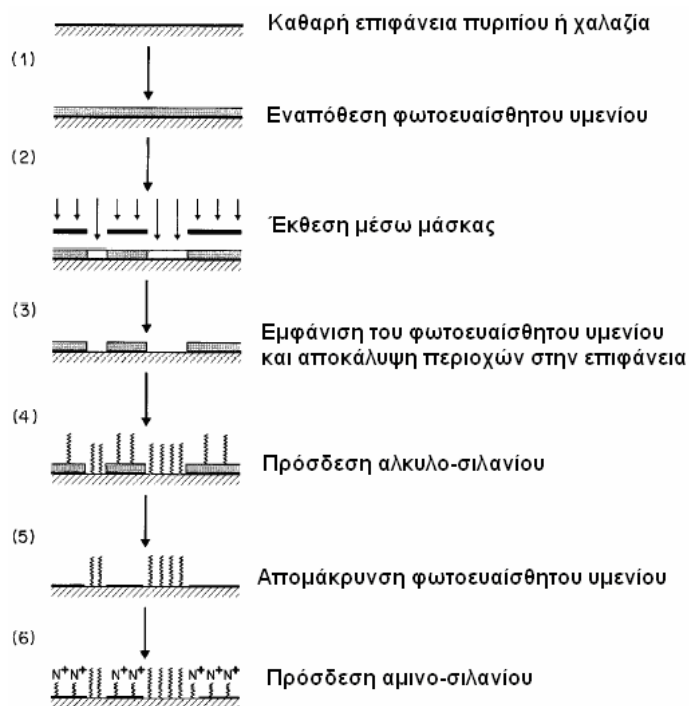
Σχήμα 52. Διεργασία αποκόλλησης (lift-off) [164].

Μία συνήθης τεχνική είναι η σχηματοποίηση ενός ΑΜΣ μέσω της διεργασίας αποκόλλησης. Το ΑΜΣ συνήθως αποτελείται από ομάδες, στις οποίες προσροφώνται οι πρωτεΐνες, ενώ τις περισσότερες φορές στο τέλος της διεργασίας περιβάλλεται από ένα ΑΜΣ, το οποίο αποτρέπει την προσρόφηση των βιομορίων και των κυττάρων στις γειτονικές περιοχές (Σχήμα 53).



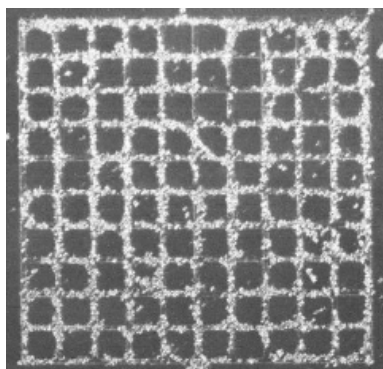
Σχήμα 53. Σχηματική απεικόνιση της λιθογραφικής διεργασίας για τη σχηματοποίηση δύο διαφορετικών ΑΜΣ στο ίδιο υπόστρωμα μέσω της φωτολιθογραφίας ενός φωτοευαίσθητου υλικού [165].

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει τη λιθογραφική διεργασία που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 53 προκειμένου να σχηματοποιήσουν κύτταρα σε κατάλληλα τροποποιημένες επιφάνειες. Από τα αρχικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν ήταν η δουλειά του Kleinfeld και των συνεργατών του [166]. Χρησιμοποίησαν δύο σιλάνια, ένα αλκυλοσιλάνιο (αλκυλο-τριχλωροσιλάνιο) και ένα αμινο-σιλάνιο (αμινο-τριυδροξυσιλάνιο). Το αλκυλο-σιλάνιο παρεμποδίζει την προσκόλληση των κυττάρων, ενώ το αμινο-σιλάνιο την ευνοεί (Σχήμα 54).



**Σχήμα 54.** Μέθοδος για την ακινητοποίηση δύο διαφορετικών ΑΜΣ σε επιφάνεια πυριτίου ή χαλαζία [166].

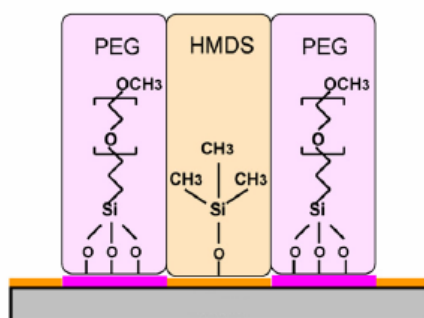
Στη συνέχεια στις τροποποιημένες επιφάνειες έγινε σπορά και καλλιέργεια κυττάρων, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 10% v/v ορό αλόγου και παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας είχαν σχηματοποιηθεί στις περιοχές που είχε ακινητοποιηθεί το αμινοσιλάνιο (Σχήμα 55).



**Σχήμα 55.** Σχηματοποιημένα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας. Η τεχνική που εφαρμόστηκε βασιζόταν στην τροποποίηση του SiO<sub>2</sub> με δύο διαφορετικά σιλάνια: ένα αμινοσιλάνιο και ένα αλκυλο-σιλάνιο [166].



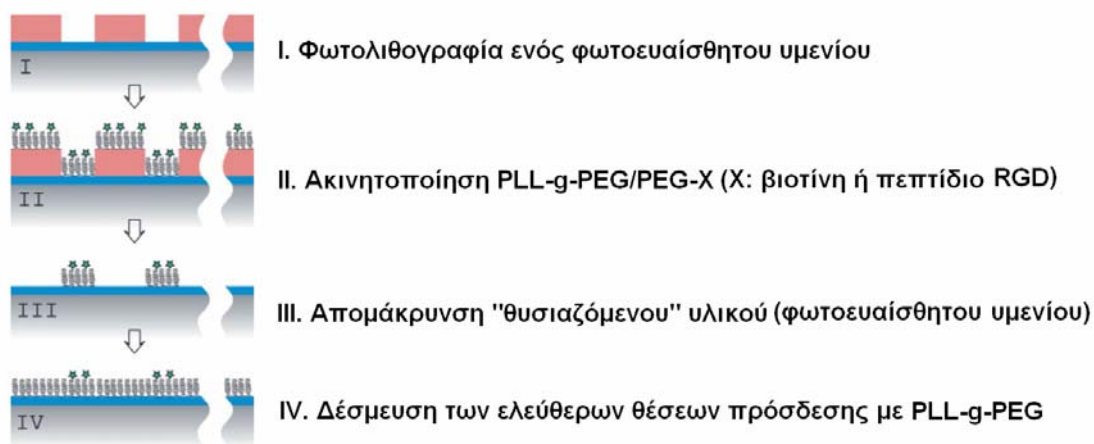
Παρόμοια τεχνική έχει εφαρμοστεί για τη σχηματοποίηση ΑΜΣ εξαμεθυλοδισιλαζάνης (hexamethyldisilazane, HMDS) στην οποία προσροφώνται οι πρωτεΐνες λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων [167]. Η διεργασία στηρίζεται στη φωτολιθογραφία ενός φωτοευαίσθητου υμενίου νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης, το οποίο χρησιμοποιείται για να σχηματοποιήσει το υποκείμενο μονομοριακό στρώμα εξαμεθυλοδισιλαζάνης στο οποίο θα ακινητοποιηθεί η πρωτεΐνη. Η αποτροπή της προσρόφησης στις γειτονικές περιοχές γίνεται και με σιλάνιο πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (methoxy-PEG silane) (Σχήμα 56). Στη συνέχεια εφαρμόζοντας τη διεργασία επιτεύχθηκε η ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στις περιοχές, που είχαν τροποποιηθεί με την εξαμεθυλοδισιλαζάνη.



**Σχήμα 56.** Τροποποιημένη επιφάνεια γυαλιού με σιλάνιο πολυ(αιθυλενογλυκόλης) και εξαμεθυλοδισιλαζάνη [167].

Παρόμοια διεργασία παρουσιάστηκε και από τον Kannan και τους συνεργάτες του [168], οι οποίοι εφαρμόζοντας φωτολιθογραφία ενός φωτοευαίσθητου υλικού θετικού τόνου σχηματοποίησαν ενεργοποιημένα γυάλινα υποστρώματα, τα οποία περιείχαν αμινομάδες, αλδεϋδομάδες ή εποξειδικές ομάδες.

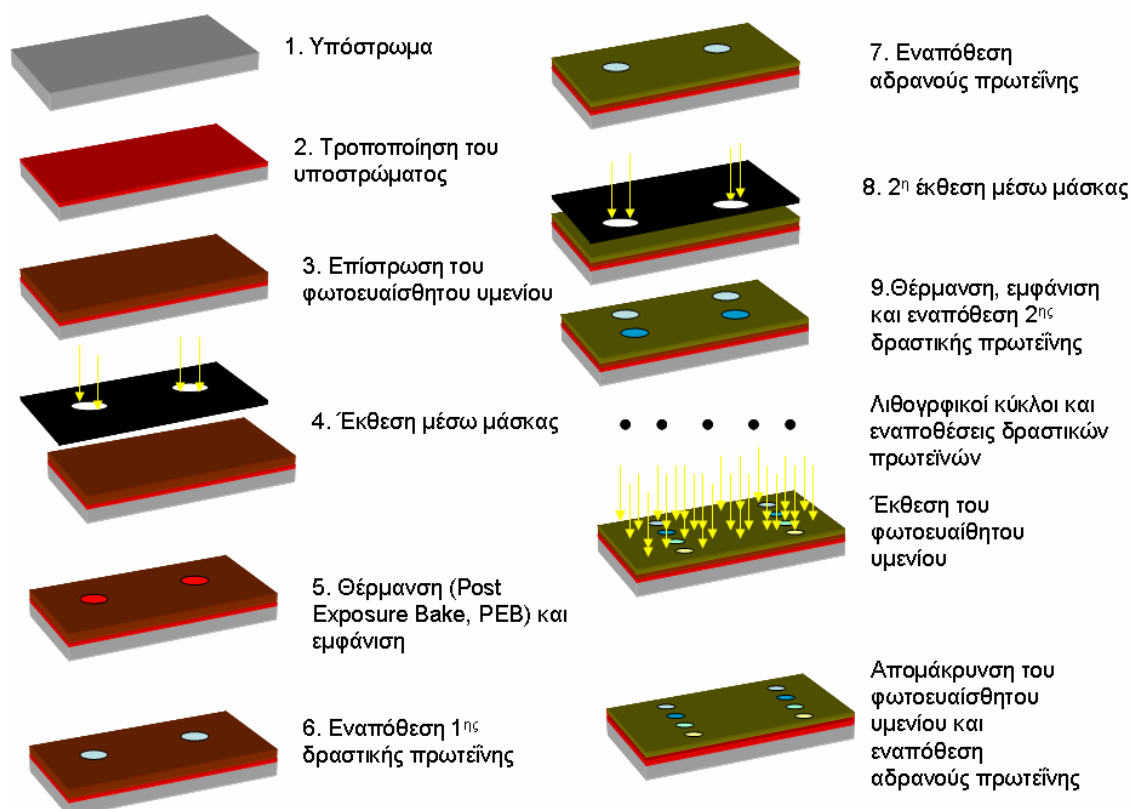
Η διεργασία της αποκόλλησης (lift-off) έχει εφαρμοστεί από πολλές ομάδες για τη σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων. Ο Falconnet και η ομάδα του [169] χρησιμοποίησαν τη διεργασία της αποκόλλησης προκειμένου να σχηματοποιήσουν τη βιοτίνη ή το πεπτίδιο που περιείχε την αλληλουχία αμινοξέων Αργινίνη-Γλυκίνη-Ασπαρτικό οξύ (Arg-Gly-Asp, RGD) (Σχήμα 57). Η σχηματοποίηση της αλληλουχίας RGD αξιοποιήθηκε για τη επιλεκτική προσκόλληση ινοβλαστών.



**Σχήμα 57.** Σχηματοποίηση της βιοτίνης ή του τριπεπτιδίου Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαρτικού οξέος (Arg-Gly-Asp, RGD) μέσω της διεργασίας της αποκόλλησης (lift-off) [169].

Επίσης, μέσω της διεργασίας αποκόλλησης έχει σχηματιστεί ο τετρα-αιθυλο γλυκίλ διμεθυλοαιθέρας. Ο τετρα-αιθυλο γλυκίλ διμεθυλοαιθέρας εναποτίθεται σε όλη την επιφάνεια, στην οποία έχει σχηματιστεί το φωτοευαίσθητο υλικό νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης. Έπειτα, η επιφάνεια εμβαπτίζεται σε ακετόνη και τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων για 20sec με αποτέλεσμα να απομακρύνεται το φωτολιθογραφημένο υλικό και ταυτόχρονα να απομακρύνεται ο τετρα-αιθυλο γλυκίλ διμεθυλοαιθέρας από αυτές τις περιοχές και να παραμένει στις υπόλοιπες. Το υλικό αυτό σχηματοποιήθηκε πάνω σε μεταλλικά ηλεκτρόδια για να τα προστατεύσει από την προσκόλληση κυττάρων και επίσης εξετάστηκε η προσρόφηση των πρωτεϊνών και βρέθηκε ότι δεν προσροφώνται ούτε οι πρωτεΐνες σε αυτό το υλικό [170], όπως έχει προαναφερθεί και στο Κεφάλαιο Α.1.3.3. Η δυνατότητα σχηματοποίησης του τετρα-αιθυλο γλυκίλ διμεθυλοαιθέρα οδήγησε στην αξιοποίησή του σε βιο-μικροηλεκτρομηχανικά συστήματα [171, 172, 173].

Μία άλλη τεχνική, με την οποία είναι εφικτή η εναπόθεση διαφορετικών βιομορίων στο ίδιο υπόστρωμα, προτείνεται από την ομάδα του Δρ. Π. Αργεϊτή [174, 175, 176]. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην καθοδήγηση των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες θέσεις του υποστρώματος μέσω της λιθογραφίας θετικού τόνου ενός φωτοευαίσθητου πολυμερικού υμενίου (Σχήμα 58). Και εδώ το φωτοευαίσθητο υμένιο χρησιμοποιείται σαν υλικό της διεργασίας και δεν είναι το υλικό πάνω στο οποίο προσροφώνται οι πρωτεΐνες. Η διεργασία αυτή είναι μετεξέλιξη της διεργασίας αποκόλλησης.



**Σχήμα 58.** Σχηματική απεικόνιση της βασικής φωτολιθογραφικής διαδικασίας διευθέτησης πολλών πρωτεϊνών στο ίδιο υπόστρωμα.

Αρχικά, επιστρώνεται το φωτοπολυμερικό υμένιο και στη συνέχεια ακολουθεί η λιθογραφική διεργασία, δηλαδή πραγματοποιείται έκθεση, θέρμανση και εμφάνιση

(λιθογραφικός κύκλος). Οι δραστικές πρωτεΐνες εναποτίθενται στις περιοχές που εμφανίζεται το φωτοπολυμερικό υμένιο. Σε κάθε λιθογραφικό κύκλο εναποτίθεται μία δραστική πρωτεΐνη. Στο τέλος της διεργασίας απομακρύνεται το φωτοπολυμερικό υμένιο μέσω έκθεσης και εμφάνισης και εναποτίθεται μια αδρανής πρωτεΐνη.

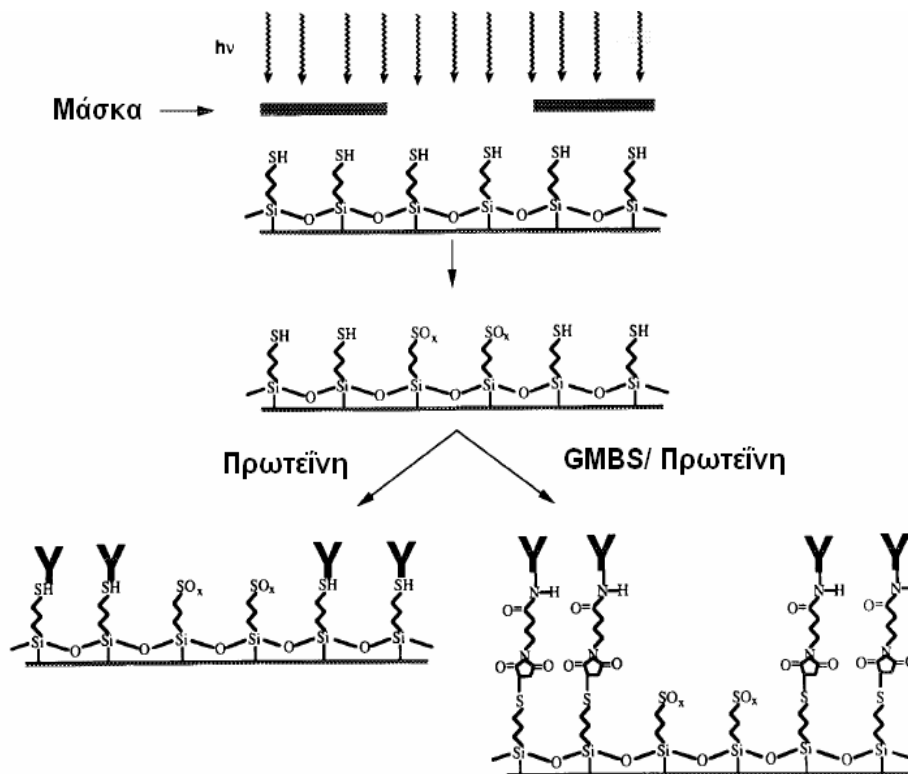
Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται όταν θερμανθούν άνω των 50-60 °C, όταν υπόκεινται σε απότομες μεταβολές του pH και όταν έρχονται σε επαφή με οργανικούς διαλύτες. Η μετουσίωση συνοδεύεται από μεταβολές τόσο στις φυσικές όσο και στις βιολογικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης εκ των οποίων η πιο σημαντική είναι η ικανότητα μοριακής αναγνώρισης. Επομένως είναι απαραίτητο οι συνθήκες της προαναφερθείσας διεργασίας να είναι βιοσυμβατές προκειμένου να διατηρηθεί η δραστικότητα των πρωτεϊνών.

Οι συνθήκες όλων των σταδίων του λιθογραφικού κύκλου που ακολουθούν την εναπόθεση βιομορίων πρέπει να είναι βιοσυμβατές [177, 178]. Συγκεκριμένα, η τελική έκθεση πρέπει να γίνεται στο κοντινό υπεριώδες ή στο ορατό χρησιμοποιώντας φίλτρα που απορροφούν όλη την ακτινοβολία με  $\lambda < 300$  nm, καθώς η έκθεση στο βαθύ υπεριώδες μπορεί να προκαλέσει διάσπαση των αμιδικών δεσμών των πρωτεϊνών και μείωση της δραστικότητάς τους. Επίσης η θέρμανση που πραγματοποιείται μετά την έκθεση πρέπει να γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία προκειμένου να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Τέλος, όλα τα στάδια της εμφάνισης του φωτοπολυμερικού υμενίου επηρεάζουν τις ήδη διευθετημένες πρωτεΐνες, καθώς το διάλυμα του εμφανιστή έρχεται σε άμεση επαφή με αυτές. Ο ελάχιστος βαθμός αραίωσης του πρότυπου υδατικού διαλύματος εμφάνισης υδροξειδίου του τετραμεθυλοαμμωνίου (Tetramethylammonium hydroxide, TMAH) που είναι ανεκτός από χαρακτηριστικές πρωτεΐνες μελετήθηκε στη Διδακτορική Διατριβή του Δρ. Α. Δούβα [174].

### 3.1.2. Επιλεκτική τροποποίηση φωτοευαίσθητων ομάδων

Μία άλλη μεθοδολογία είναι η φωτοχημική τροποποίηση ενός ΑΜΣ που έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχουν περιοχές που αποτρέπουν την προσρόφιση βιομορίων και κυττάρων και περιοχές στις οποίες προσδένονται τα βιομόρια και τα κύτταρα.

Ο Bhatia και οι συνεργάτες του [179] παρουσίασαν μία μέθοδο που στηρίζεται στη φωτοχημική τροποποίηση ενός ΑΜΣ που έχει ως τερματική ομάδα μια θειολική ομάδα (thiol group), η οποία παρουσία οξυγόνου και μετά από έκθεση σε UV οξειδώνεται και αποτρέπει την πρόσδεση των πρωτεϊνών (Σχήμα 59). Η αποτροπή της προσρόφισης των πρωτεϊνών, μάλλον, οφείλεται στην παρουσία φορτίου (charge-based repulsion). Οι θειολικές ομάδες που δεν εκτέθηκαν στο UV είτε αντιδρούν μέσω των κυστεϊνών που υπάρχουν στις πρωτεΐνες είτε ενεργοποιούνται για να είναι δυνατή η χημική πρόσδεση των πρωτεϊνών μέσω των πρωτοταγών αμινομάδων που υπάρχουν σε αυτές. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένας παράγοντας που έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει σταυροδεσμούς (cross-linking agent), ο  $\gamma$ -μαλεϊδοβουτυρικός-N-ηλεκτριμιδοεστέρας (N- $\gamma$ -maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester, GMBS), ο οποίος μεσολαβεί για την αντίδραση των θειολικών ομάδων με τις πρωτοταγείς αμίνες που υπάρχουν στα αμινοξέα των πρωτεϊνών που ακινητοποιήθηκαν. Δοκιμάστηκαν και άλλα ΑΜΣ σιλανίων με τερματικές ομάδες αμινές, εποξειδικές ομάδες και υπερφθόρο ομάδες (perfluoro), στα οποία όμως δεν υπήρχε διαφοροποίηση στην προσρόφιση των πρωτεϊνών μεταξύ εκτεθειμένων και ανέκθετων περιοχών.

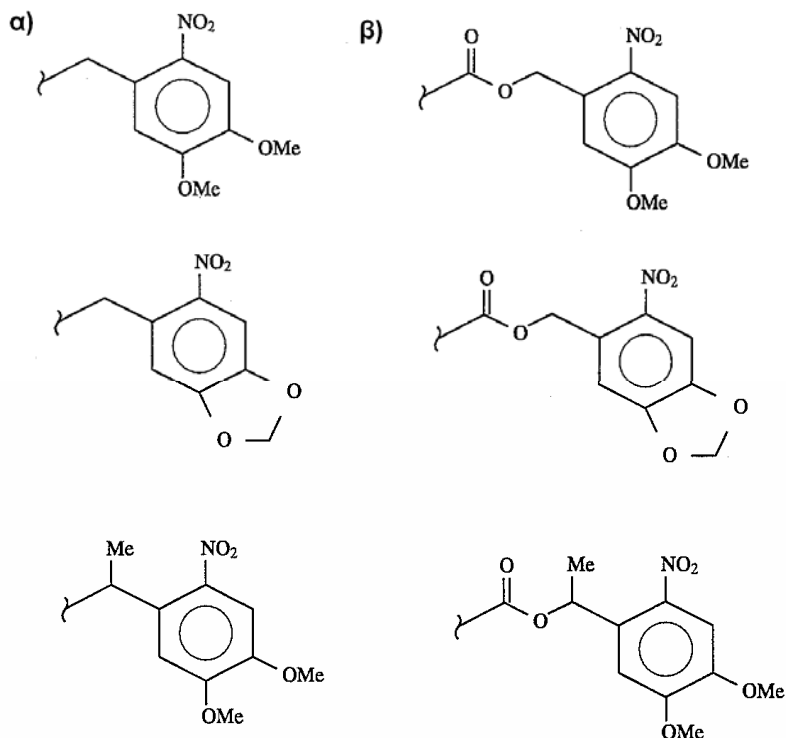


**Σχήμα 59.** Τροποποίηση AMM μέσω ακτινοβολίας UV για την επίτευξη της επιλεκτικής προσρόφησης πρωτεϊνών [179].

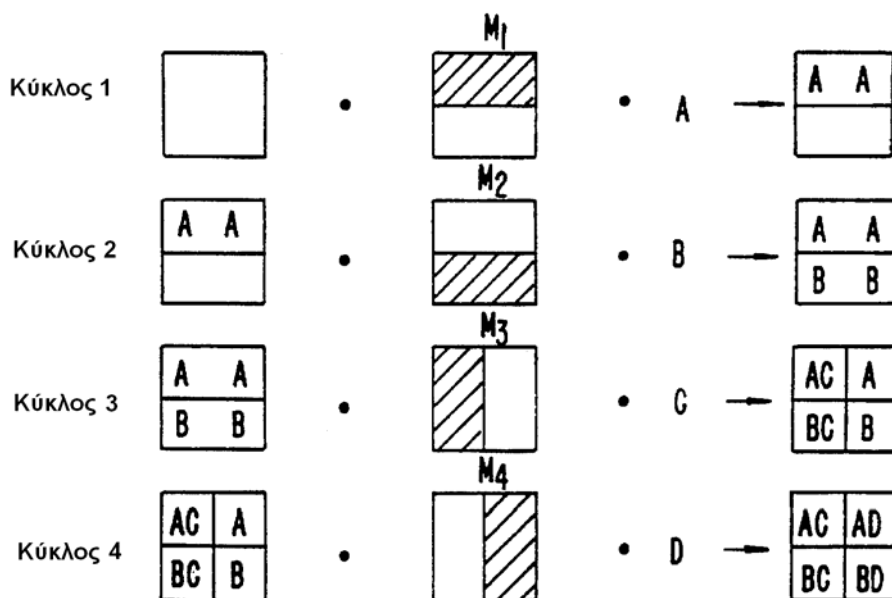
Η μεθοδολογία της τοπικής φωτοχημικής τροποποίησης μιας ουσίας, η οποία έχει προσδεθεί στο υπόστρωμα έχει εφαρμοστεί και από πολλές ερευνητικές ομάδες για την επίτευξη της σχηματοποίησης πεπτιδίων ή πρωτεϊνών.

Ο Fodor και οι συνεργάτες του [180] έχουν παρουσιάσει το σχηματισμό πεπτιδίων σε στερεό υπόστρωμα βασιζόμενοι στην πρόσδεση φωτοευαίσθητων προστατευτικών ομάδων (protective groups) στα αμινοξέα [181]. Οι φωτοευαίσθητες προστατευτικές ομάδες προσδένονται είτε στην αμινομάδα είτε στην καρβοξυλομάδα του αμινοξέος. Ορισμένες φωτοευαίσθητες προστατευτικές ομάδες, οι οποίες προσδένονται στις καρβοξυλομάδες των αμινοξέων είναι η 6-νιτροβερατρυλομάδα (6-nitroveratryl), η 6-νιτροπιπερονυλο ομάδα (6-nitropiperonyl), η μεθυλο-6-νιτροβερατρυλομάδα (methyl-6-nitroveratryl) και ορισμένες φωτοευαίσθητες προστατευτικές ομάδες, οι οποίες προσδένονται στις αμινομάδες των αμινοξέων είναι η 6-νιτροβερατρυλοξυκαρβονυλο ομάδα (6-nitroveratryloxycarbonyl), η 6-νιτροπιπερονυλοξυκαρβονυλο ομάδα (6-nitropiperonyloxycarbonyl), η μεθυλο-6-νιτροβερατρυλοξυκαρβονυλο ομάδα (methyl-6-nitroveratryloxycarbonyl) (Σχήμα 60).

Όταν τα αμινοξέα, στα οποία έχουν προσδεθεί οι φωτοευαίσθητες προστατευτικές ομάδες εκτεθούν στην ακτινοβολία που απορροφά η προστατευτική ομάδα τότε η αμινομάδα ή η καρβοξυλομάδα του αμινοξέος αποδεσμεύεται και μπορεί να αντιδράσει με την καρβοξυλομάδα ή την αμινομάδα του αμινοξέος που έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα πεπτίδιο πάνω στο στερεό υπόστρωμα. Η ακινητοποίηση πολλών διαφορετικών πεπτιδίων στο ίδιο στερεό υπόστρωμα πραγματοποιείται μετά από έκθεση διαφορετικών περιοχών και ακινητοποίηση διαφορετικών αμινοξέων (Σχήμα 61).

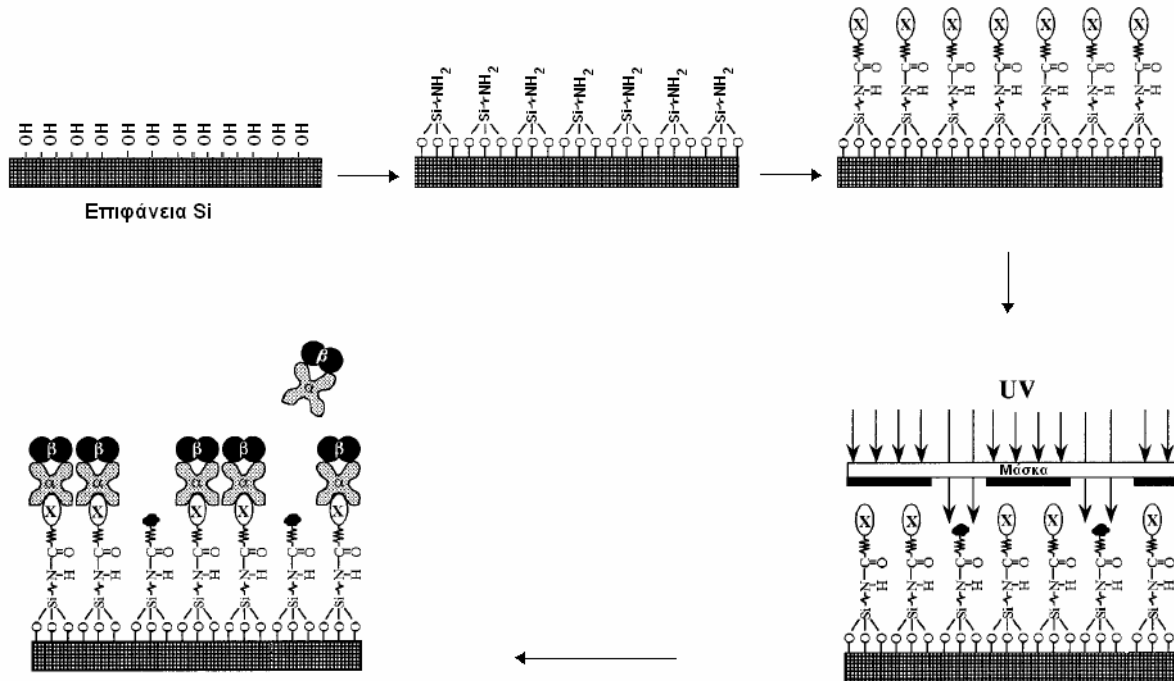


**Σχήμα 60.** Παραδείγματα φωτοευαίσθητων προστατευτικών ομάδων οι οποίες προσδένονται είτε α) στις καρβοξυλομάδες των αμινοξέων 6-νιτροβερατρυλομάδα (6-nitroveratryl), 6-νιτροπιπερονυλο ομάδα (6-nitropiperonyl), μεθυλο-6-νιτροβερατρυλομάδα (methyl-6-nitroveratryl) β) στις αμινομάδες των αμινοξέων 6-νιτροβερατρυλοξυκαρβόνυλο ομάδα (6-nitroveratryloxycarbonyl), 6-νιτροπιπερονυλοξυκαρβόνυλο ομάδα (6-nitropiperonyloxycarbonyl), μεθυλο-6-νιτρο-βερατρυλοξυκαρβόνυλο ομάδα (methyl-6-nitroveratryloxycarbonyl) [181].



**Σχήμα 61.** Παράδειγμα της μεθόδου για την ακινητοποίηση διαφορετικών διπεπτιδίων στο ίδιο υπόστρωμα. Οι περιοχές που παρουσιάζονται με διαγράμμιση είναι οι περιοχές στις οποίες πραγματοποιείται έκθεση. Τα γράμματα A, B, C, D αναφέρονται σε διαφορετικά αμινοξέα. Στον κάθε κύκλο πραγματοποιείται έκθεση σε μία περιοχή του υποστρώματος και εναποτίθεται ένα αμινοξύ [181].

Στη συνέχεια παρατίθεται η τεχνική στην οποία το μόριο της βιοτίνης φέρει μία φωτοευαίσθητη ομάδα με σκοπό την καθοδηγούμενη πρόσδεση της στρεπταβιδίνης μέσω της ακινητοποίησης της βιοτίνης (Σχήμα 62) [182].



**Σχήμα 62.** Φωτοχημική τροποποίηση της NHS-βιοτίνης για την καθοδηγούμενη πρόσδεση της στρεπταβιδίνης. Το γράμμα X δηλώνει τη βιοτίνη, το α δηλώνει την στρεπταβιδίνη και το β τη Β-φυκοερυθρίνη (B-phycoerythrin) [182].

Αρχικά στην υδροξυλιωμένη επιφάνεια προσδένεται το ΑΜΣ αμινοσιλανίου. Στη συνέχεια προσδένεται ομοιοπολικά το μόριο της βιοτίνης, το οποίο φέρει μια φωτοευαίσθητη ομάδα, τον 6-βιοτιναμινο εξανοϊκό-N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα (N-Hydroxysuccinimidyl) 6-(biotinamido)hexanoate (biotin-long arm-NHS). Η ομάδα αυτή κατά την έκθεσή της σε υπεριώδη ακτινοβολία απενεργοποιείται με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης. Με αυτόν τον τρόπο η πρόσδεση του μορίου της στρεπταβιδίνης καθοδηγείται στις ανέκθετες περιοχές (Σχήμα 62) [123, 182].

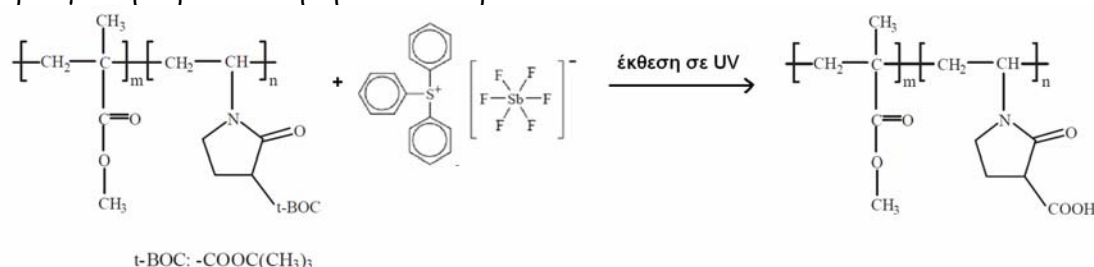
### 3.1.3. Επιλεκτική τροποποίηση φωτοευαίσθητων πολυμερών

Μία άλλη μεθοδολογία είναι η φωτοχημική τροποποίηση πολυμερικών υμενίων, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχουν περιοχές που αποτρέπουν την προσρόφηση βιομορίων και κυττάρων και περιοχές στις οποίες τα βιομόρια και τα κύτταρα προσδένονται.

Ένα παράδειγμα είναι το συμπολυμερές μεθακρυλικός μεθυλεστέρας-co-3-τριτοταγής βουτοξυκαρβονυλο-N-βινυλο-2-πυρρολιδόνη (methyl methacrylate-co-3-(t-butoxycarbonyl)-N-vinyl-2-pyrrolidone). Η φωτοχημική τροποποίησή του παρουσιάζεται στο Σχήμα 63 [183].

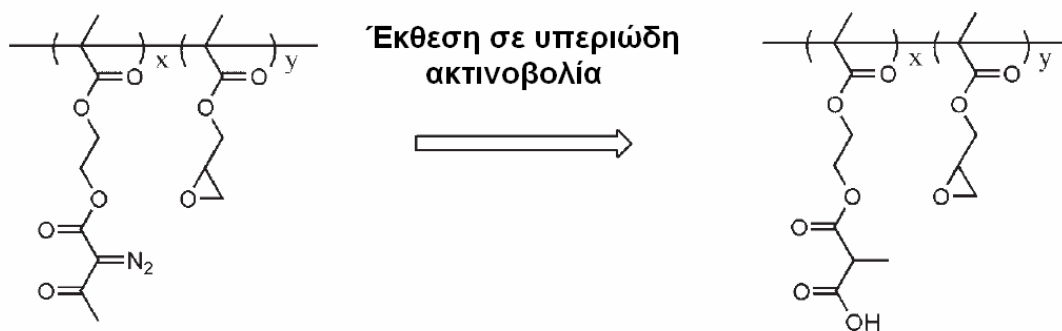
Το συμπολυμερές μεθακρυλικός μεθυλεστέρας-co-3-τριτοταγής βουτυλεστέρας-N-βινυλο-2-πυρρολιδόνη τροποποιείται μέσω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία παρουσία φωτο-παραγωγού οξέος με αποτέλεσμα τα κύτταρα να προσκολλώνται στις εκτεθειμένες περιοχές. Η προσκόλληση των κυττάρων αποδόθηκε στη χημεία του

προϊόντος που προκύπτει μετά την έκθεση. Το πολυμερές αυτό δεν είναι τοξικό και οι καρβοξυλομάδες που δημιουργούνται μπορούν να αξιοποιηθούν για περαιτέρω τροποποίηση της επιφάνειας. Για παράδειγμα μπορεί να προσδεθεί χημικά το τριπεπτιδίο Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαρτικού οξέος (Arg-Gly-Asp, RGD), το οποίο προάγει την προσκόλληση των κυττάρων.



**Σχήμα 63.** Τροποποίηση του συμπολυμερούς μεθακρυλικός μεθυλεστέρας-co-3-τριτοταγής βουτυλεστέρας-N-βινυλο-2-πυρρολιδόνη μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και παρουσία του φωτο-παραγωγού οξέος εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφωφονίου [183].

Η ίδια κεντρική ιδέα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη σχηματοποίηση κυττάρων μέσω της εφαρμογής άλλων πολυμερών, τα οποία τροποποιούνται φωτοχημικά και τα κύτταρα προσκολλώνται επιλεκτικά είτε στις εκτεθειμένες είτε στις ανέκθετες περιοχές. Η σύνθεση ενός βιοσυμβατού φωτοευαίσθητου υλικού παρουσιάστηκε από τον Kim και τους συνεργάτες του [184]. Το υλικό αυτό είναι το συμπολυμερές 2-(2-διαζω-3-οξυ-βουτυριλοοξυ)αιθυλ μεθακρυλικός εστέρας-co-γλυκιδυλ μεθακρυλικός εστέρας [2-(2-diazo-3-oxo-butylglyoxy)ethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate], το οποίο μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV σχηματίζει καρβοξυλομάδες (Σχήμα 64). Τα κύτταρα προσκολλώνται στις εκτεθειμένες περιοχές του υμενίου. Η προτίμηση αυτή πιθανολογείται ότι οφείλεται στη διαφορετική χημεία των εκτεθειμένων και των ανέκθετων περιοχών.

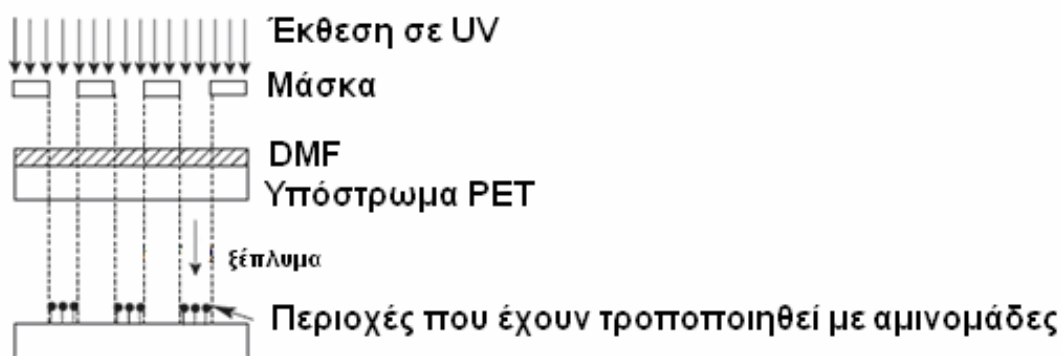


**Σχήμα 64.** Τροποποίηση του υμενίου του συμπολυμερούς 2-(2-διαζω-3-οξυ-βουτυριλοοξυ)αιθυλ μεθακρυλικός εστέρας-co- γλυκιδυλ μεθακρυλικός εστέρας μέσω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία [184].

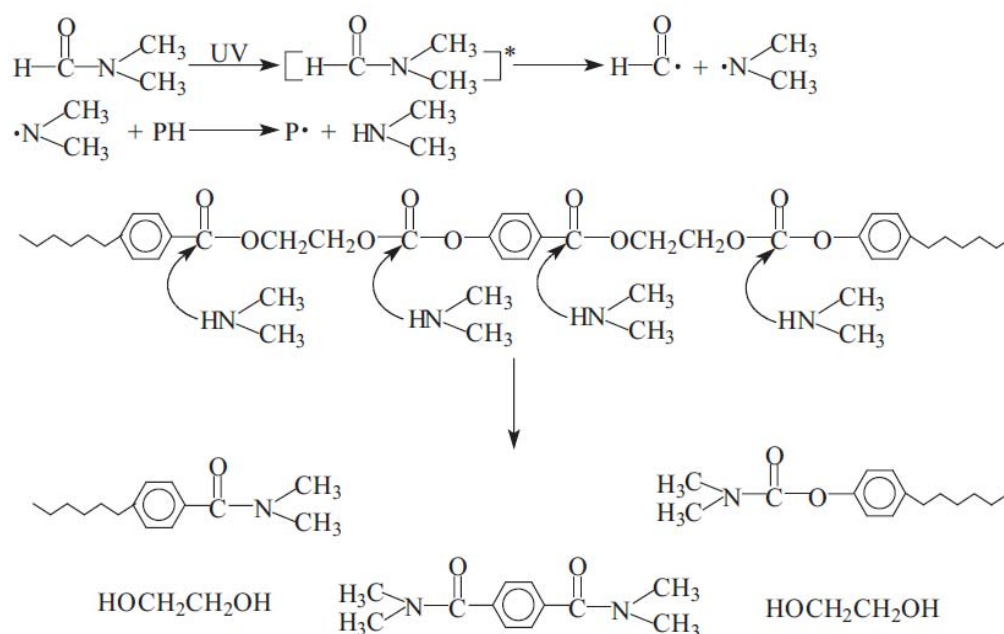
Ο Yang και η ομάδα του [185] παρασκεύασαν σχηματοποιημένες επιφάνειες που βασίζονται στην τροποποίηση του πολυ(αιθυλενο τereφθαλικού εστέρα) [poly(ethylene terephthalate), (PET)] μέσω της επαφής του με το διμεθυλοφορμαμίδιο (Dimethylformamide, DMF) και της έκθεσης σε ακτινοβολία UV (Σχήμα 65).

Το διμεθυλοφορμαμίδιο, HCON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, μέσω έκθεσης σε ακτινοβολία UV υφίσταται φωτοδιάσπαση δίνοντας ως προϊόν μία διμεθυλοάμινο ρίζα, η οποία αντιδρά με τις αλυσίδες του PET με αποτέλεσμα να τροποποιείται το PET με

αμινομάδες (Σχήμα 66). Στη συνέχεια οι αμινομάδες (θετικά φορτία) μπορούν να αξιοποιηθούν για την προσρόφηση πρωτεϊνών.



Σχήμα 65. Σχηματική απεικόνιση της φωτο-καθοδηγούμενης τροποποίησης του PET [185].



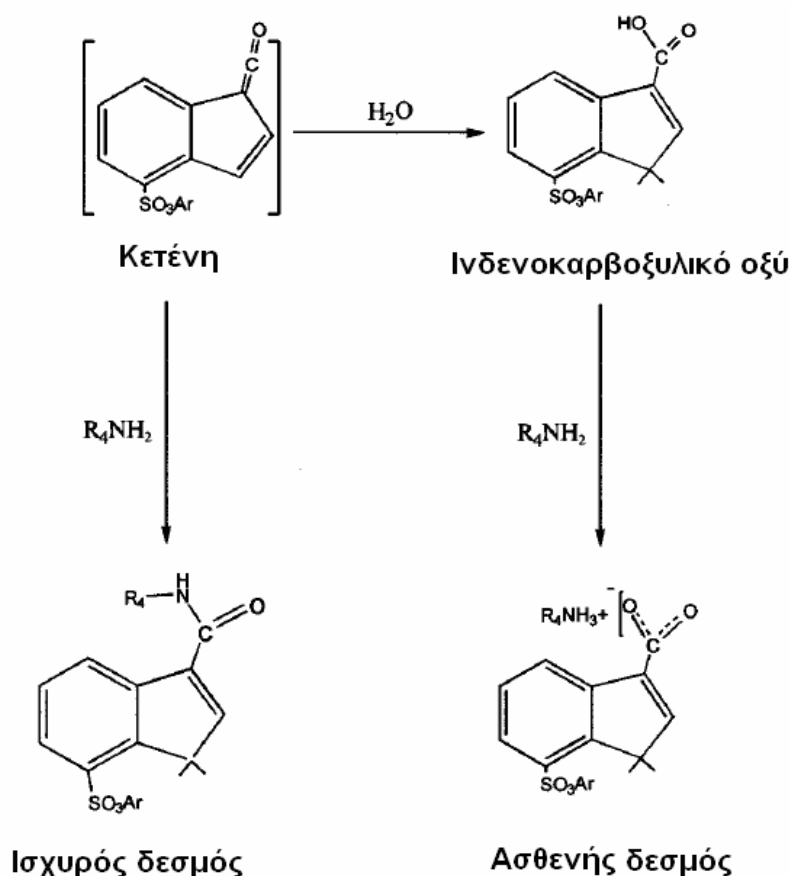
Σχήμα 66. Αντιδράσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ του PET και του DMF κατόπιν ακτινοβόλησης σε UV [185].

Ο Nicolau και η ομάδα του πραγματοποίησαν επιτυχώς τη σχηματοποίηση πρωτεϊνών μέσω χημικής ρόφησης χρησιμοποιώντας υμένια νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης, η οποία είναι ένα συμπολυμερές κρεσόλης-φορμαλδεΐδης και παράγωγα διαζωναφθοκινόνης ως φωτοευαίσθητοποιητές [186]. Συγκεκριμένα μελέτησε το υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης για θετικού τόνου και αρνητικού τόνου λιθογραφία και το υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης/ιμιδαζόλης για θετικού τόνου και αρνητικού τόνου λιθογραφία και πραγματοποίησε την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών με δύο τρόπους: μέσω χημικής πρόσδεσης των αμινομάδων της πρωτεΐνης (direct patterning) και μέσω καρβοδιϊμιδίου (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) για να προσδεθεί η πρωτεΐνη στην επιφάνεια (EDC-mediated attachment). Η πρόσδεση των πρωτεϊνών έγινε είτε κατά τη διάρκεια της έκθεσης στη θετικού τόνου λιθογραφία (wet process) είτε μετά την πραγματοποίηση ενός



λιθογραφικού κύκλου θετικής λιθογραφίας (end positive dry process) είτε μετά το πέρας αρνητικού τόνου λιθογραφίας (end negative dry process).

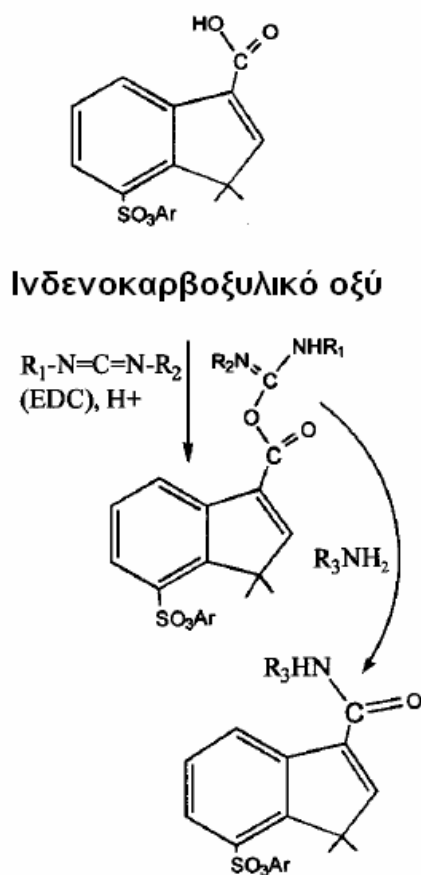
Αναλυτικότερα στη διεργασία της πρόσδεσης των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της έκθεσης (wet process), το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετείται ανάμεσα στη μάσκα και το φωτοευαίσθητο υμένιο με σκοπό να αντιδράσουν οι αμινομάδες των πρωτεϊνών με τη κετένη που δημιουργείται κατά την έκθεση της διαζωναφθοκινόνης (in-situ linkage). Σε αυτή τη μεθοδολογία η παρουσία του νερού από τα υδατικά διαλύματα των πρωτεϊνών μειώνει την απόδοση της επιλεκτικής προσρόφησης γιατί όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο Α.2.2.3.1.1 η κετένη παρουσία μορίων νερού οδηγεί στο σχηματισμό καρβοξυλικού οξέος (ινδενοκαρβοξυλικό οξύ), το οποίο συνδέεται μέσω ιοντικού δεσμού με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών (Σχήμα 67). Ο δεσμός αυτός είναι ασθενής και μπορεί να σπάσει όταν η επιφάνεια ξεπλυθεί.



**Σχήμα 67.** Αντίδραση της κετένης με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, η οποία πραγματοποιείται στη διεργασία της πρόσδεσης των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της έκθεσης (wet process) και η παράπλευρη ανεπιθύμητη αντίδραση του ινδενοκαρβοξυλικού οξέος, που παράγεται από την κετένη παρουσία νερού, με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών [186].

Στις ξηρές διεργασίες (dry process) χρησιμοποιήθηκε η νεολάκα / διαζωναφθοκινόνη με ή χωρίς ιμιδαζόλη (imidazole) για λιθογραφία θετικού τόνου και αρνητικού τόνου. Όταν εφαρμόστηκε θετικού τόνου λιθογραφία μπορούσαν να προσδεθούν περισσότερες πρωτεΐνες μέσω της πραγματοποίησης πολλών λιθογραφικών κύκλων. Κατά τη λιθογραφία θετικού τόνου παράγεται ινδενοκαρβοξυλικό οξύ, το οποίο μέσω του καρβοδιϊμιδίου σχηματίζει ισχυρό δεσμό με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών (Σχήμα 68), ενώ όπως προαναφέρθηκε η απευθείας

αντίδραση του ινδενοκαρβοξυλικού οξέος με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών οδηγεί στο σχηματισμό ενός ασθενούς και ασταθούς δεσμού.



**Σχήμα 68.** Αντίδραση του ινδενοκαρβοξυλικού οξέος με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών παρουσία του καρβοδιϊμιδίου. Ο δεσμός αυτός είναι ισχυρός [186].

Όσον αφορά τη λιθογραφία αρνητικού τόνου είναι αδύνατη η πρόσδεση πολλών πρωτεϊνών γιατί δεν μπορούν να γίνουν πολλοί λιθογραφικοί κύκλοι. Στη λιθογραφία αρνητικού τόνου αρχικά πραγματοποιήθηκε έκθεση μέσω μάσκας σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος και στη συνέχεια το φωτοευαίσθητο υμένιο θερμάνθηκε στους 100 °C για 30 min. Στην περίπτωση του φωτοευαίσθητου υμενίου που δεν περιείχε ιμιδαζόλη η θέρμανση πραγματοποιήθηκε παρουσία αμμωνίας. Τέλος πραγματοποιήθηκε έκθεση σε όλο το υμένιο έτσι ώστε να σχηματιστεί το ινδενοκαρβοξυλικό οξύ στο οποίο προσδέθηκε η πρωτεΐνη είτε μετά την ενεργοποίηση με καρβοδιϊμίδιο (ισχυρός δεσμός με αμινομάδες πρωτεϊνών) είτε χωρίς αυτήν (ασθενής δεσμός με αμινομάδες πρωτεϊνών).

Το σύστημα νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης/ιμιδαζόλης παρουσιάζει μεγάλη διακριτική ικανότητα και οι λιθογραφίες που πραγματοποιούνται με αυτό το σύστημα δεν έχουν ατέλειες (defect-free) σε σύγκριση με το σύστημα νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης. Όμως το υλικό αυτό έχει μικρή διάρκεια ζωής λόγω της παρουσίας της βάσης (ιμιδαζόλη), η οποία καταστρέφει τη διαζωναφθοκινόνη με αποτέλεσμα να μειώνεται η ευαισθησία του υλικού.

Στη συνέχεια ο Nicolau χρησιμοποίησε το συμπολυμερές πολυ(μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας-co-μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) [187]. Ο πολυ(μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας-co-μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) είναι ένα υδρόφοβο πολυμερές το οποίο στη συγκεκριμένη προτεινόμενη μέθοδο σχηματοποιήθηκε μέσω λιθογραφίας δέσμης ηλεκτρονίων. Για μικρές δόσεις έκθεσης

ο μεθακρυλικός βουτυλεστέρας μετατρέπεται σε μεθακρυλικό οξύ, ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις έκθεσης ολοκληρώνεται η μετατροπή του μεθακρυλικού βουτυλεστέρα σε μεθακρυλικό οξύ και σπάει ο μεθακρυλικός μεθυλεστέρας, με αποτέλεσμα το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς να είναι μικρότερο καθώς τα μονομερή του μεθακρυλικού μεθυλεστέρα είναι λιγότερα μετά από μεγάλες δόσεις έκθεσης. Το μερικώς εκτεθειμένο υμένιο, το οποίο είναι υδρόφιλο, αποτρέπει τη φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών, ενώ οι πρωτεΐνες προσροφώνται στο αρχικό ανέκθετο υμένιο. Έτσι μέσω έκθεσης τροποποιείται τοπικά το υμένιο και επιτυγχάνεται η επιλεκτική προσρόφηση των πρωτεϊνών στις ανέκθετες περιοχές.

Επίσης, ο Nicolau δοκίμασε να πραγματοποιήσει τη πρόσδεση των πρωτεϊνών μέσω της χημείας του καρβοδιϊμιδίου χρησιμοποιώντας το συμπολυμερές του πολυ(μεθακρυλικού τριτοταγούς βουτυλεστέρα-co-μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) [187]. Η κεντρική ιδέα ήταν οι καρβοξυλομάδες που δημιουργούνται μετά από έκθεση του πολυ(μεθακρυλικού τριτοταγούς βουτυλεστέρα-co-μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) σε δέσμη ηλεκτρονίων να αντιδράσουν μέσω καρβοδιϊμιδίου με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών. Η χημική πρόσδεση στις εκτεθειμένες περιοχές επετεύχθη αλλά υπήρξε φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών στις περιοχές του ανέκθετου υμενίου με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σχηματοποίηση των πρωτεϊνών.

Τέλος, από τον Nicolau χρησιμοποιήθηκαν τα δύο πολυμερή, η νεολάκα/ διαζωναφθοκινόνη και ο πολυ(μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας) για να δημιουργηθεί διαβάθμιση στην υδροφοβικότητα και να προσροφηθούν επιλεκτικά οι πρωτεΐνες με επιτυχία στον πολυ(μεθακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα) [188]. Αρχικά επιστρώνεται το υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης πάνω από το υμένιο του πολυ(μεθακρυλικού τριτοταγή βουτυλεστέρα). Στη συνέχεια εκτίθενται ορισμένες περιοχές του υμενίου νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης και ακολουθεί απομάκρυνση αυτών των περιοχών μέσω εμφάνισης σε βασικό διάλυμα. Με αυτή τη διεργασία έχουν σχηματιστεί δομές νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης πάνω από τον πολυ(μεθακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα). Οι δομές της νεολάκας / διαζωναφθοκινόνης είναι σχετικά υδρόφοβες, ενώ ο πολυ(μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας) είναι υδρόφοβη επιφάνεια. Στη συνέχεια για να δημιουργηθούν περιοχές υδρόφοβες και υδρόφιλες έτσι ώστε να προτρέπεται η επιλεκτική προσρόφηση των πρωτεϊνών στις υδρόφοβες περιοχές εφαρμόζεται στις σχηματοποιημένες επιφάνειες έκθεση από πηγή έκθεσης που επηρεάζει μόνο τις δομές νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης που έχουν σχηματιστεί πάνω στο υμένιο του πολυ(μεθακρυλικού τριτοταγούς βουτυλεστέρα). Η έκθεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να παράγεται ινδενοκαρβοξυλικό οξύ και οι δομές νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης να γίνονται υδρόφιλες. Τέλος οι σχηματοποιημένες επιφάνειες εμβαπτίζονται σε διάλυμα πρωτεϊνών με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να προσροφώνται στον πολυ(μεθακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα) καθώς αυτή είναι η υδρόφοβη επιφάνεια (protein-on-bottom mode).

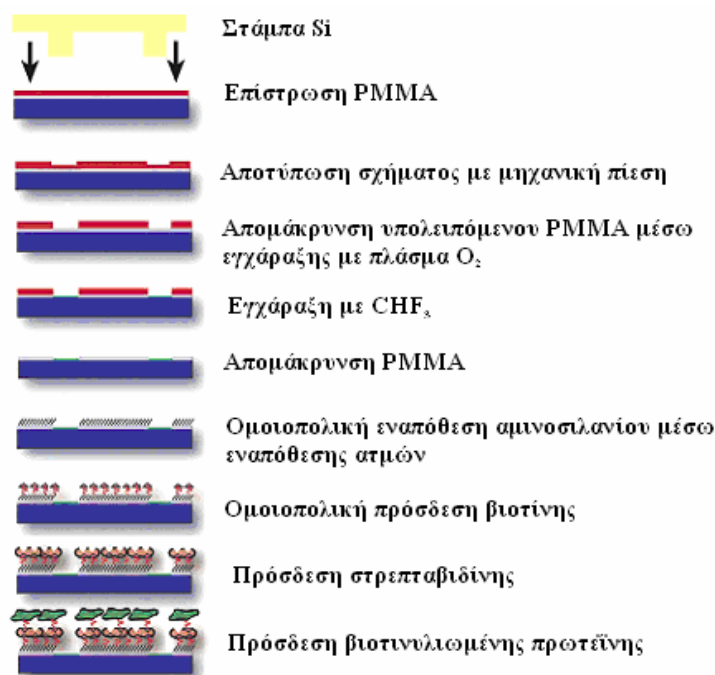
Επίσης, ακολουθήθηκε και δεύτερη μεθοδολογία στην οποία η παρουσία του υμενίου του πολυ(μεθακρυλικού τριτοταγούς βουτυλεστέρα) είναι περιττή, δηλαδή το υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης μπορεί να επιστρωθεί και πάνω σε γυαλί. Στη δεύτερη μεθοδολογία οι σχηματοποιημένες δομές νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης εκθέτονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα  $H_2O_2/HCl$ , το οποίο προκαλεί τη διασταύρωση της νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης, με αποτέλεσμα να γίνεται υδρόφοβη, ενώ παράλληλα υδροφιλοποιείται το υπόστρωμα. Επομένως οι πρωτεΐνες θα προσροφηθούν στις δομές νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης, που σε αυτήν την

περίπτωση είναι η υδρόφοβη επιφάνεια, και όχι στο υπόστρωμα (protein-on-top mode).

Ουσιαστικά, στις μεθοδολογίες που περιγράφηκαν παραπάνω μεταβάλλεται η υδροφιλικότητα και η υδροφοβικότητα των σχηματοποιημένων επιφανειών με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες, που προσροφώνται στις υδρόφοβες επιφάνειες, να προσροφώνται είτε στο υποκείμενο πολυμερές είτε στις υπερκείμενες δομές. Τα καλύτερα αποτελέσματα, ως προς τη διακριτική ικανότητα και την επιλεκτική προσρόφηση των πρωτεϊνών, ελήφθησαν στην περίπτωση της πρώτης μεθοδολογίας (protein-on-bottom mode) [188].

### 3.2. Σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων μέσω εύπλαστης λιθογραφίας ή μέσω λιθογραφίας νανοαποτυπώματος

Η εύπλαστη λιθογραφία και η λιθογραφία νανοαποτυπώματος δεν απαιτούν ιδιαίτερο εξοπλισμό και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη σχηματοποίηση επιφανειών λόγω της απουσίας οπτικών φαινομένων, τα οποία παρατηρούνται στη φωτολιθογραφία όπως φαινομένων περίθλασης, σκέδασης και ανάκλασης. Όμως, περιορίζονται σε μικρές περιοχές, γύρω στο  $1\text{cm}^2$ , και στην περίπτωση της εύπλαστης λιθογραφίας που χρησιμοποιείται στάμπα από PDMS είναι αναπόφευκτη η καταστροφή της στάμπας λόγω των ελαστικών ιδιοτήτων του PDMS. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν μερικά παραδείγματα για την σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων με εφαρμογή της εύπλαστης λιθογραφίας και της λιθογραφίας νανοαποτυπώματος.

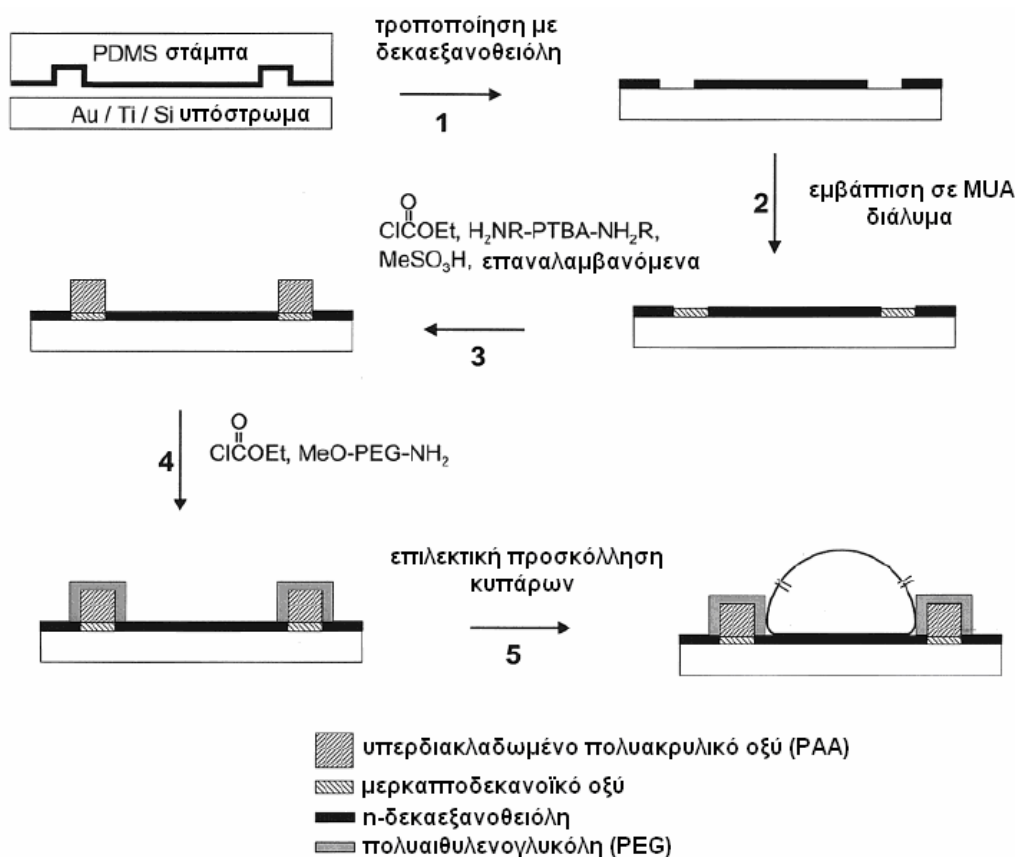


Σχήμα 69. Διεργασία κατασκευής μικροσυστοιχίας βιομορίων με εύπλαστη λιθογραφία [189].

Στο Σχήμα 69 παρουσιάζεται η κατασκευή μιας μικροσυστοιχίας με λιθογραφία νανοαποτυπώματος [189]. Αρχικά, επιστρώνεται υμένιο πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστερά) (PMMA) πάνω στο διοξείδιο του πυριτίου. Το υμένιο του PMMA σχηματοποιείται μέσω εφαρμογής πίεσης από ένα σκληρό καλούπι πυριτίου. Έπειτα, απομακρύνεται το υπολειπόμενο PMMA από τις σχηματοποιημένες περιοχές μέσω εγχάραξης με πλάσμα  $\text{O}_2$ . Στη συνέχεια, το διοξείδιο του πυριτίου εγχάρασσεται σε

ατμόσφαιρα  $\text{CHF}_3$  με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός στρώματος  $\text{CF}_x$  στην επιφάνειά του. Το στρώμα  $\text{CF}_x$  χρησιμοποιείται για την αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών. Ακολουθεί η απομάκρυνση του PMMA με υπερήχους σε ακετόνη. Έπειτα το διοξείδιο του πυριτίου που υπάρχει σε ορισμένα σημεία της επιφάνειας αντιδρά με το αμινοσιλάνιο, στο οποίο προσδένεται η βιοτίνη. Στη βιοτίνη προσδένεται η στρεπταβιδίνη, στην οποία μπορεί να προσδεθεί η προς προσδιορισμό βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη [123, 189].

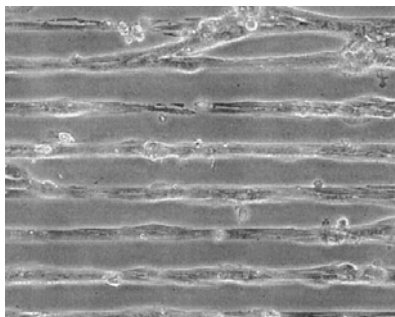
Ένα άλλο παράδειγμα στηρίζεται στην εφαρμογή των υπερδιακλαδωμένων πολυμερών. Τα υπερδιακλαδωμένα πολυμερή μπορούν να αναπτυχθούν (εμβολισμός από) σε ανόργανα και οργανικά υποστρώματα και παρέχουν καλύτερη επικάλυψη της επιφάνειας συγκρινόμενα με τα γραμμικά πολυμερή [49] όπως έχει παρουσιαστεί στο Κεφάλαιο Α.1.1.2.2.1.



**Σχήμα 70.** Επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων με εφαρμογή υπερδιακλαδωμένων πολυμερών [190].

Τα υπερδιακλαδωμένα πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων [190]. Αρχικά το καλούπι μεταφέρει την n-δεκαεξανθειόλη (n-hexadecylthiol, C16SH) στο υπόστρωμα χρυσού (Σχήμα 70). Στις μη τροποποιημένες περιοχές δημιουργείται ΑΜΣ μερκαπτοδεκανοϊκού οξέος (Mercaptoundecanoic acid, MUA). Οι περιοχές που έχουν τροποποιηθεί με το MUA εκτίθενται σε ενεργοποιημένο με αμινομάδες πολυ(ακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα) [amine-functionalized poly(tert-butylacrylate), PTBA], το οποίο στη συνέχεια υδrolύεται σε πολυακρυλικό οξύ [poly(acrylic acid), PAA]. Οι δομές που έχουν δημιουργηθεί επικαλύπτονται με PEG για την ελαχιστοποίηση της πρόσδεσης κυττάρων σε αυτές. Έπειτα οι επιφάνειες αποστειρώνονται με έκθεση σε ακτινοβολία UV (365 nm) και στη συνέχεια τα κύτταρα προσκολλώνται στις περιοχές που δεν υπάρχει η PEG [123, 190].

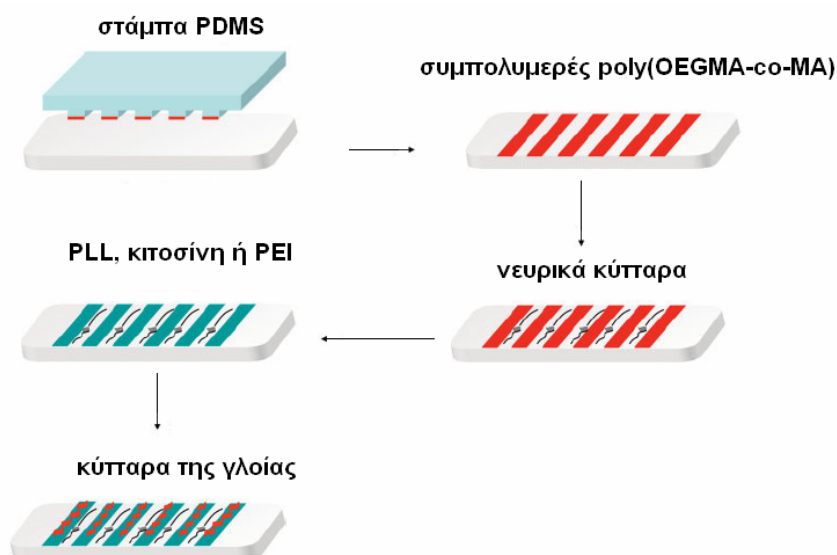
Σε μία άλλη τεχνική μέσω της στάμπας του PDMS έχει μεταφερθεί λαμινίνη πάνω σε επιφάνεια τροποποιημένη με τετρα-αιθυλο γλυκιλ διμεθυλοαιθέρα [191]. Ο τετρα-αιθυλο γλυκιλ διμεθυλοαιθέρας έχει παρουσιαστεί και στο Κεφάλαιο Α.3.1.1. όπου έχει σχηματοποιηθεί μέσω διεργασίας αποκόλλησης και είχε αξιοποιηθεί ως υλικό για την αποτροπή της προσκόλλησης κυττάρων. Σε αυτήν την περίπτωση η λαμινίνη, η οποία είναι πρωτεΐνη προσκόλλησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, εναποτίθεται μέσω της στάμπας PDMS σε συγκεκριμένες περιοχές της επιφάνειας που έχει τροποποιηθεί με τετρα-αιθυλο γλυκιλ διμεθυλοαιθέρα με αποτέλεσμα να σχηματοποιούνται τα κύτταρα, καθώς προσκολλώνται μόνο στις περιοχές που υπάρχει η λαμινίνη (Σχήμα 71) [191].



**Σχήμα 71.** Σχηματοποίηση κυττάρων σε γραμμές στις οποίες υπήρχε λαμινίνη. Η λαμινίνη εναποτίθεται από στάμπα PDMS σε επιφάνεια τροποποιημένη με τετρα-αιθυλο γλυκιλ διμεθυλοαιθέρα [191].

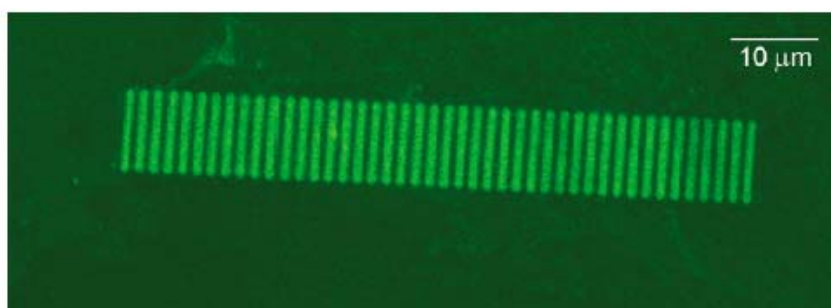
Επίσης, η δημιουργία σχηματοποιημένων συν-καλλιιεργειών διαφορετικών κυττάρων (co-cultures) είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη μελέτη των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Στο Σχήμα 72 παρουσιάζεται μία μέθοδος για τη σχηματοποίηση δύο διαφορετικών κυττάρων στο ίδιο υπόστρωμα [192].

Αρχικά, σχηματοποιείται το υπόστρωμα με δομές συμπολυμερούς μεθακρυλικής ολιγοαιθυλενογλυκόλης-co-μεθακρυλικού οξέος [oligo(ethylene glycol) methacrylate, (OEGMA)] και μεθακρυλικού οξέος (MA), poly(OEGMA-co-MA), το οποίο εναποτίθεται σε συγκεκριμένα σημεία του υποστρώματος μέσω επαφής με στάμπα PDMS, η οποία φέρει το συγκεκριμένο διάλυμα. Στη συνέχεια εναποτίθενται νευρικά κύτταρα, τα οποία προσκολλώνται στις μη τροποποιημένες περιοχές. Για να προσροφηθεί ο δεύτερος τύπος κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η πολυ(λυσίνη) (poly-L-lysine, PLL), η κίτοσίνη (chitosan), ή η πολυ(αιθυλενιμίνη) [poly(ethylenimine), PEI], τα οποία προσδένονται στο συμπολυμερές λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Τα υλικά αυτά είναι διαθέσιμα στο εμπόριο. Η πολυ(λυσίνη) είναι ένα συνθετικό βιοσυμβατό πεπτίδιο που χρησιμοποιείται για την τροποποίηση επιφανειών έτσι ώστε να προσκολληθούν σε αυτές νευρικά κύτταρα. Η PLL δεν επιδρά στη βιολογική δραστηριότητα των κυττάρων. Η κίτοσίνη συντίθεται από N-ακετυλογλυκοζαμίνη (N-acetylglucosamine) και γλουκοζαμίνη (glucosamine) και χρησιμοποιείται στη μεταφορά φαρμάκων (drug delivery), στην επούλωση πληγών (wound healing) και στη μηχανική των ιστών. Η PEI χρησιμοποιείται στην προσκόλληση νευρικών κυττάρων σε πλαστικά και γυάλινα υποστρώματα. Εφαρμόζοντας αυτά τα υλικά ο δεύτερος τύπος κυττάρων προσδένεται στις περιοχές που υπάρχει το συμπολυμερές. Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε υπόστρωμα και να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων διαφορετικών κυττάρων.



**Σχήμα 72.** Διεργασία για την προσκόλληση δύο διαφορετικών τύπων κυττάρων στο ίδιο υπόστρωμα [192].

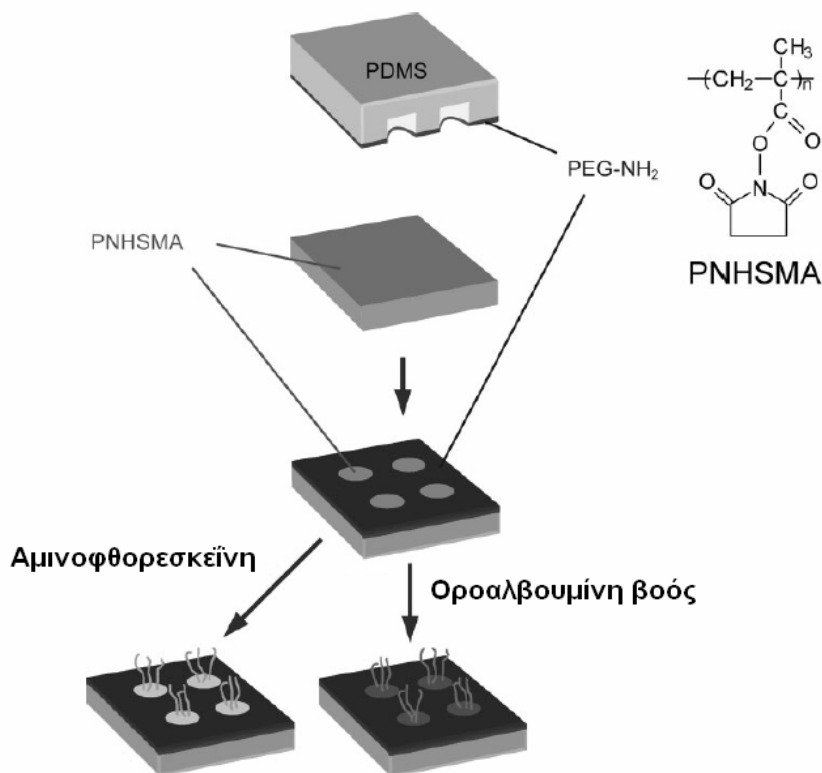
Επίσης, η σχηματοποίηση του πολυκατιοντικού διακλαδισμένου συμπολυμερούς (polycationic graft copolymer) πολυ-L-λυσίνης-g-πολυαιθυλενογλυκόλης [poly-L-lysine-g-poly(ethylene glycol), PLL-g-PEG] πάνω σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες έχει πραγματοποιηθεί μέσω εύπλαστης λιθογραφίας δημιουργώντας περιοχές που ανθίστανται στη προσρόφηση πρωτεϊνών και κυττάρων [193]. Για τη δημιουργία επιλεκτικής προσρόφησης πρωτεϊνών χρησιμοποιείται το PLL-g-PEG τροποποιημένο με το τριπεπτίδιο Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαρτικού οξέος (Arg-Gly-Asp, RGD), το οποίο εναποτίθεται μέσω στάμπας σε συγκεκριμένες περιοχές, ενώ στη συνέχεια γίνεται εμβάπτιση της επιφάνειας σε διάλυμα PLL-g-PEG για να αποτρέπεται η προσρόφηση πρωτεϊνών στην υπόλοιπη επιφάνεια (Σχήμα 73) [193].



**Σχήμα 73.** Επιλεκτική προσρόφηση πρωτεϊνών στις περιοχές που έχει εναποτεθεί PLL-g-PEG-RGD. Πλάτος γραμμών 1μm [193].

Μία ακόμα διεργασία στην οποία χρησιμοποιείται η PEG για να επιτευχθεί η σχηματοποίηση βιομορίων παρουσιάζεται στο Σχήμα 74 [194]. Αρχικά το υπόστρωμα τροποποιείται με υμένιο μεθακρυλικού Ν-ηλεκτριμιδοεστέρα [poly(N-succinimidyl methacrylate), PNHSMA], το οποίο επιστρώνεται πάνω σε πυρίτιο ή σε γυαλί. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εγγραφή με μικροεπαφή του PEG-NH<sub>2</sub>. Συγκεκριμένα, η στάμπα PDMS διαποτίζεται από PEG-NH<sub>2</sub> εμβαπτιζόμενη σε διάλυμα για 60 min. Η εναπόθεση του PEG-NH<sub>2</sub>, τοπικά, πραγματοποιείται μέσω της μηχανικής πίεσης της στάμπας πάνω στο υμένιο. Η στάμπα πιέζεται μηχανικά πάνω

στο υμένιο για διάφορους χρόνους, έτσι ώστε να προσδιοριστεί ο κατάλληλος χρόνος για την επαρκή κάλυψη της επιφάνειας που θα έχει ως αποτέλεσμα την αποτροπή της πρόσδεσης των βιομορίων στις περιοχές αυτές. Η σχηματοποιημένη πλέον επιφάνεια εμβαπτίζεται σε διαλύματα αμινοφθορεσκεΐνης (fluoresceinamine) ή οροαλβουμίνης βοός (Bovine Serum Albumin, BSA).



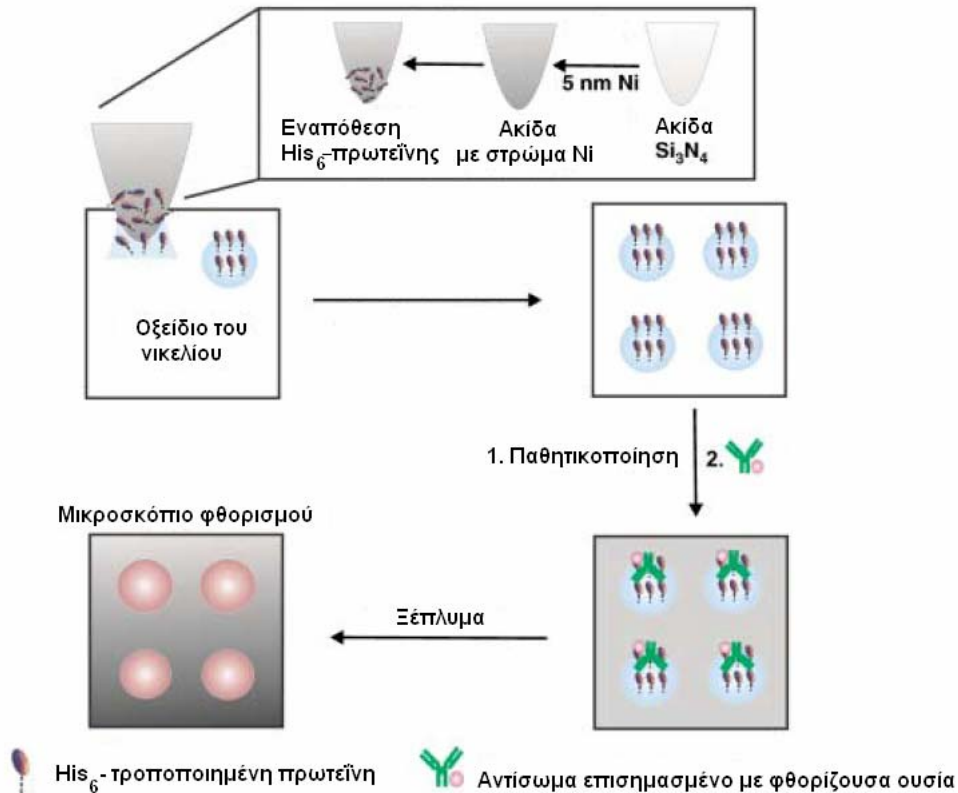
**Σχήμα 74.** Τροποποίηση του υμενίου του μεθακρυλικού N-ηλεκτριμιδοεστέρα με PEG-NH<sub>2</sub> μέσω εγγραφής με μικροεπαφή, προκειμένου να επιτευχθεί η σχηματοποίηση της αμινοφθορεσκεΐνης ή της οροαλβουμίνης βοός [194].

### 3.3. Σχηματοποίηση βιομορίων και κυττάρων μέσω λιθογραφίας με ακίδες σάρωσης

Μέσω της λιθογραφίας με ακίδες σάρωσης επιτυγχάνεται η σχηματοποίηση βιομορίων σε συγκεκριμένες θέσεις με διακριτική ικανότητα νανομέτρων (nm) [195]. Επίσης, η λιθογραφία με ακίδες σάρωσης πραγματοποιείται σε αδρανές περιβάλλον και δεν απαιτείται πηγή μεγάλης ενέργειας, αλλά ο χρόνος της διεργασίας είναι μεγάλος.

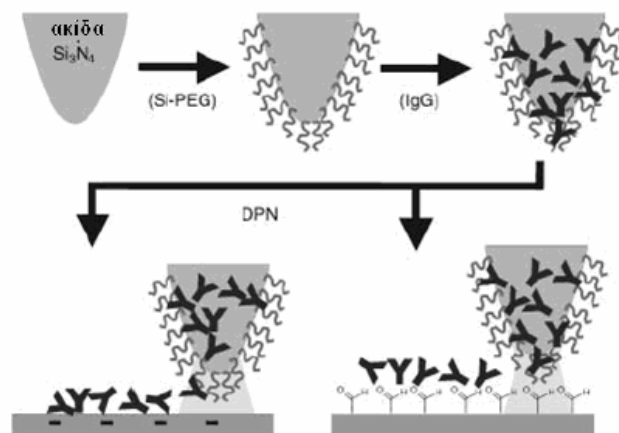
Ένα παράδειγμα εφαρμογής της λιθογραφίας με ακίδες σάρωσης για την εναπόθεση βιομορίων σε επιφάνεια νικελίου παρουσιάζεται στο Σχήμα 75 [196]. Για να διευκολυνθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών είχε εναποτεθεί (coated) ένα λεπτό στρώμα Ni στην ακίδα του AFM. Στη συνέχεια η ακίδα εμβαπτίστηκε σε διάλυμα πρωτεΐνης τροποποιημένης με ιστιδίνη (His-tagged (His<sub>6</sub>) protein), η οποία εναποτέθηκε στην επιφάνεια του νικελίου. Ακολούθως, η γύρω περιοχή «παθητικοποιήθηκε» με πεπτίδια τροποποιημένα με ιστιδίνη και κατόπιν οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν με αντισώματα που έφεραν φθορίζουσα ουσία. Παρόμοια διεργασία με αυτήν που προαναφέρθηκε έχει παρουσιαστεί και με την τροποποίηση της ακίδας με χρυσό [197].





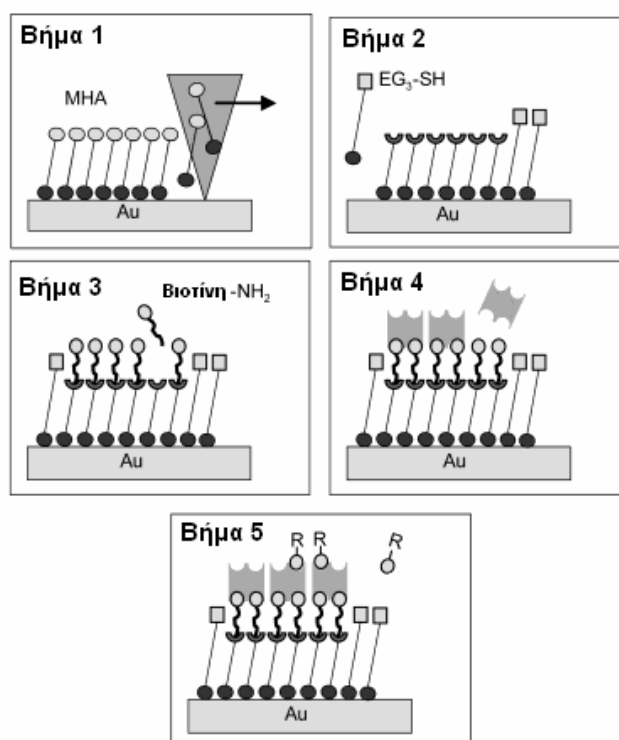
**Σχήμα 75.** Εναπόθεση πρωτεΐνης σε επιφάνεια οξειδίου του νικελίου με ακίδα σάρωσης [196].

Σε μία άλλη προσέγγιση η ακίδα του AFM τροποποιείται αρχικά με σιλάνιο ολιγοαιθυλενογλυκόλης, συγκεκριμένα με το 2-[μεθοξυ πολυ(αιθυλενοξυ)προπυλο]τριμεθοξυ σιλάνιο (2-[methoxy poly(ethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane) και μετά εμβαπτίζεται σε διάλυμα πρωτεΐνης (Σχήμα 76) [198]. Η αρχική τροποποίηση της ακίδας AFM έχει ως στόχο την αποφυγή της μετουσίωσης της πρωτεΐνης, η οποία θα μπορούσε να λάβει χώρα πάνω στην ακίδα του AFM και επιπλέον μειώνει την ενέργεια που απαιτείται για την μεταφορά της πρωτεΐνης από την ακίδα στην επιφάνεια. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη ακινητοποιείται είτε μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σε επιφάνεια διοξειδίου του πυριτίου (αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια) είτε μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης σε επιφάνεια τροποποιημένη με αλδεϋδομάδες, οι οποίες θα αντιδράσουν με τις αμινομάδες της πρωτεΐνης [198].



**Σχήμα 76.** Εναπόθεση πρωτεΐνης με ακίδα σάρωσης σε επιφάνεια οξειδίου του πυριτίου είτε μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια) είτε μέσω ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των αμινομάδων της πρωτεΐνης με τις αλδεϋδομάδες της επιφάνειας [198].

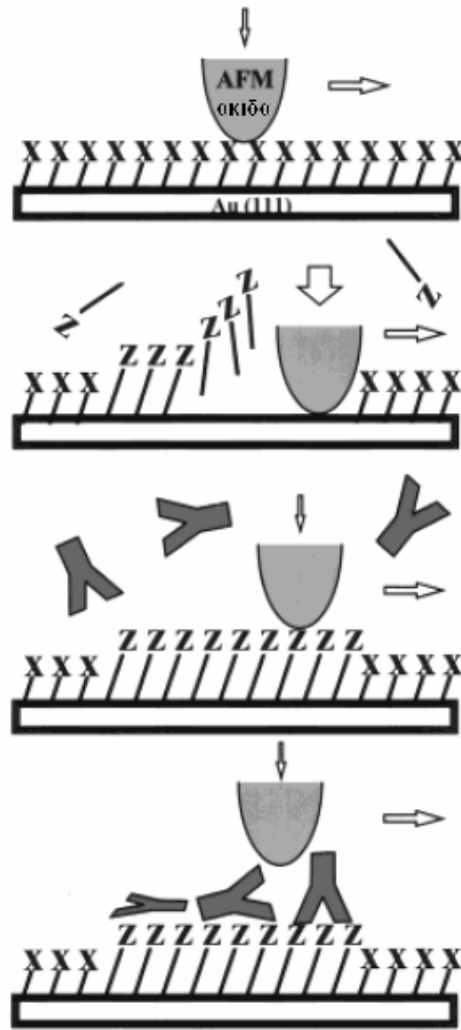
Όμως, η ακίδα του AFM έχει χρησιμοποιηθεί και για την εναπόθεση ΑΜΣ. Ένα παράδειγμα παρουσιάστηκε από τον Huynh και την ομάδα του [199], ο οποίος εναπόθεσε σε επιφάνεια χρυσού το ΑΜΣ 16-μερκαπτοεξαδεκανοϊκό οξύ [(16-mercaptohexadecanoic acid), ΜΗΑ] μέσω της ακίδας του AFM (Σχήμα 77). Ακολούθως, παθητικοποίησε την γύρω περιοχή μέσω εμβάπτισης σε ΑΜΣ ολιγοαιθυλενογλυκόλης [11-mercaptoundecyl-tri(ethylene glycol) (EG<sub>3</sub>-SH)]. Κατόπιν, οι τερματικές καρβοξυλομάδες του ΑΜΣ ΜΗΑ τροποποιήθηκαν μέσω αντίδρασης με καρβοδιϊμίδιο [1-ethyl-3-(dimethylamino)propyl carbodiimide] και Ν-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (N-hydroxysuccinimide). Στη συνέχεια, ακινητοποιήθηκε παράγωγο βιοτίνης με αμινομάδα, στην οποία ακινητοποιήθηκε στρεπταβιδίνη επισημασμένη με φθορίζουσα ουσία. Τέλος, στη στρεπταβιδίνη ακινητοποιήθηκε βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός.



**Σχήμα 77.** Ακινητοποίηση βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε στρεπταβιδίνη, η οποία είχε αλληλεπιδράσει με παράγωγο βιοτίνης με αμινομάδα, το οποίο είχε ακινητοποιηθεί σε 16-μερκαπτοεξαδεκανοϊκό οξύ (ΜΗΑ). Το ΜΗΑ είχε εναποτεθεί με ακίδα σάρωσης σε επιφάνεια χρυσού [199].

Μία άλλη τεχνική όπου χρησιμοποιείται η ακίδα του AFM είναι η τεχνική του νανοεμβολισμού (nanografting). Στην τεχνική του νανοεμβολισμού η ακίδα του AFM χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση ενός ΑΜΣ και την αντικατάστασή του από ένα άλλο ΑΜΣ, με τελικό αποτέλεσμα σε μία επιφάνεια να υπάρχουν δύο διαφορετικά ΑΜΣ.

Ο K. Wadu-Mesthrige και η ομάδα του [200] χρησιμοποίησαν αυτή την τεχνική προκειμένου να ακινητοποιήσουν σε επιφάνεια χρυσού δύο διαφορετικά ΑΜΣ θειολών, στο ένα οι τερματικές ομάδες ήταν μεθυλομάδες, ενώ στο άλλο καρβοξυλομάδες. Στη συνέχεια στην επιφάνεια χρυσού, στην οποία είχαν ακινητοποιηθεί τα δύο διαφορετικά ΑΜΣ, ακινητοποιήθηκαν επιλεκτικά πρωτεΐνες (Σχήμα 78).



**Σχήμα 78.** Εφαρμογή της μεθόδου του νανοεμβολισμού για την ακινητοποίηση δύο διαφορετικών ΑΜΣ σε επιφάνεια χρυσού. Η επιφάνεια αυτή τελικά αξιοποιείται για τη σχηματοποίηση πρωτεϊνών [200].

Συνολικά παρουσιάστηκαν οι φωτο-καθοδηγούμενες μέθοδοι, οι τεχνικές λιθογραφίας μέσω καλουπιών και η λιθογραφία με ακίδες σάρωσης για τη σχηματοποίηση των πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία προτιμήθηκε να εφαρμοστούν οι φωτο-καθοδηγούμενες μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στη φωτολιθογραφία, προκειμένου οι προτεινόμενες τεχνικές να μπορούν να συνδυαστούν με κατασκευές βιο-μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων, βιοαισθητήρων, μικροσυστοιχιών, ενώ παράλληλα να μπορούν να αξιοποιηθούν και στη βασική έρευνα για μελέτες που αφορούν πρωτεΐνες και κύτταρα.



## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΥΛΙΚΑ

#### 1.1. Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Γαλακτικός αιθυλεστέρας, (Ethyl Lactate, EL) βαθμού καθαρότητας 98%, της Aldrich Co.
- Οξικός εστέρας του μεθυλαιθέρα της προπυλενογλυκόλης (Propylene Glycol Methyl Ether Acetate, PGMEA) βαθμού καθαρότητας 99%, της Aldrich Co.
- Ισοπροπανόλη (Isopropyl Alcohol) βαθμού καθαρότητας 99.8%, της Panreac.
- Ακετόνη (Acetone) βαθμού καθαρότητας 99.5%, της Lab Scan.
- Διαλύματα βάσης υδροξειδίου του τετραμεθυλοαμμωνίου (Tetramethyl Ammonium Hydroxide, TMAH), τα οποία προκύπτουν με αραίωση με απιονισμένο νερό του πρότυπου υδατικού διαλύματος βάσης TMAH συγκέντρωσης 0.26 N της Clariant Co. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται στην εμφάνιση και είναι γνωστό με την εμπορική ονομασία AZ 726 MIF (διάλυμα AZ).
- Διμεθυλο σουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide, DMSO) της Fluka.
- Αιθανόλη (Ethanol) καθαρότητας 70%, του εμπορίου.
- Μεθυλο-Ισοβουτυλο-Κετόνη (Methyl Isobutyl Ketone, MIBK) της Sigma Aldrich.
- Διμεθυλοφορμαμίδιο (Dimethylformamide, DMF) από την Sigma Aldrich.

#### 1.2. Πολυμερή

Τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Πολυ(βινυλική αλκοόλη) (Polyvinyl alcohol, PVA) με μέσο μοριακό βάρος Mw 13000-23000 98% υδρολυμένη (hydrolyzed) της Aldrich.
- Πολυ(βινυλική αλκοόλη) με μέσο μοριακό βάρος Mw 15000 86-89% υδρολυμένη (hydrolyzed) της Fluka.
- Πολυστυρένιο (Polystyrene, PS) με μέσο μοριακό βάρος Mw 280000 της Aldrich.
- Ακρυλικά τετραπολυμερή [πολυ(μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας-co-μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας-co-μεθακρυλικός ισοβορνυλικός εστέρας-co-ακρυλικό οξύ)] [poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-t-butyl methacrylate-co-isobornyl methacrylate-co-acrylic acid), PHETIMA] με διάφορες αναλογίες βάρους των αντίστοιχων μονομερών, τα οποία συντέθηκαν από τον Δρ. Κ. Διακουμάκο με πολυμερισμό ελευθέρων ριζών [174, 175, 201, 202]. Η πειραματική διαδικασία σύνθεσής τους παρουσιάζεται στο Παράρτημα E.1. Η ονομασία PHETIMA των ακρυλικών τετραπολυμερών προέρχεται από τα ακρωνύμια των μονομερών τους. Στον Πίνακα 3 δίνονται οι αναλογίες % των μονομερών που σχηματίζουν το PHETIMA 1 και το PHETIMA 2.

**Πίνακας 3.** Σύσταση των PHETIMA 1 και PHETIMA 2.

	<b>HEMA</b>	<b>TBMA</b>	<b>IBMA</b>	<b>AA</b>
PHETIMA 1	30%	20%	40%	10%
PHETIMA 2	25%	30%	35%	10%

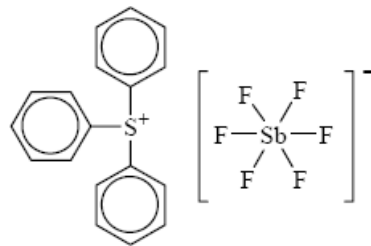
Το RHETIMA 1 είναι πιο υδρόφιλο τετραπολυμερές, λόγω της παρουσίας των υδροξυλομάδων της HEMA σε μεγαλύτερο ποσοστό, σε σχέση με το RHETIMA 2.

- Πολυμερές εποξειδωμένης νεολάκας ΕΡΙΚΟΤΕ της Shell. Από το πολυμερές αυτό με τη διαδικασία της κλασμάτωσης λαμβάνεται το μέσου μοριακού βάρους κλάσμα του, το οποίο με την προσθήκη φωτοευαισθητοποιητή δίνει τη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη ΕΡΡ (Epoxy Resist), η οποία χρησιμοποιείται στη λιθογραφία.
- Πολυμερές νεολάκας κρεσόλης-φορμαλδεΐδης της εταιρείας Clariant. Η νεολάκα αυτή είναι ένα συμπολυμερές της κρεσόλης και φορμαλδεΐδης, διατίθεται στο εμπόριο με την εμπορική ονομασία ΑΖ5214, και περιέχει διαζωναφθοκινόνη ως φωτοευαισθητοποιητή. Η ακριβής αναλογία νεολάκας /διαζωναφθοκινόνης δεν είναι γνωστή γιατί κατοχυρώνεται από το απόρρητο της ευρεσιτεχνίας που έχει εκδοθεί.

### 1.3. Φωτοευαισθητοποιητές

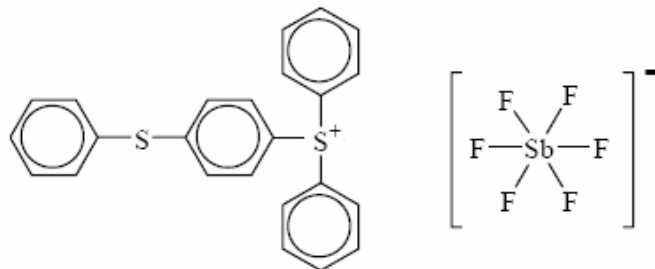
Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι φωτοευαισθητοποιητές:

- Το εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (Triphenylsulfonium hexafluoroantimonate, TPS-SbF<sub>6</sub>) (Σχήμα 79) της Midori Kagaku, το οποίο έχει την εμπορική ονομασία TPS-103. Χρησιμοποιήθηκε ως φωτοπαραγωγός οξέος.



Σχήμα 79. Συντακτικός τύπος του εξαφθοροαντιμονικού άλατος του τριφαινυλοσουλφονίου.

- Το εξαφθοροαντιμονικό άλας του φαινυλθειοφαινυλο διφαινυλοσουλφονίου (Phenylthiophenyl-diphenyl sulfonium hexafluoroantimonate, PSP-DPS) (Σχήμα 80) της Midori Kagaku, το οποίο έχει την εμπορική ονομασία DTS-103. Χρησιμοποιήθηκε ως φωτοπαραγωγός οξέος.



Σχήμα 80. Συντακτικός τύπος του εξαφθοροαντιμονικού άλατος του φαινυλοθειοφαινυλο διφαινυλοσουλφονίου (PSP-DPS).

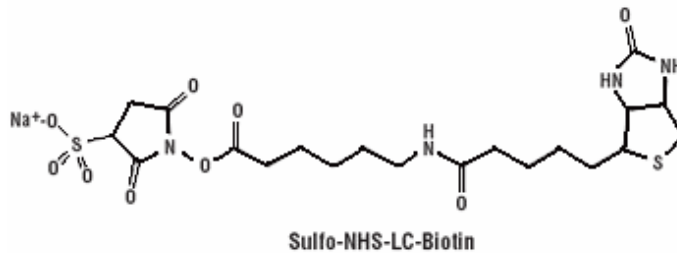
- Η πολυοξομεταλλική ένωση (ΠΟΜ) (Polyoxometalate, POM) 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ, H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>, της Aldrich Co. Χρησιμοποιήθηκε ως φωτοοξειδωτής.

- Η πολυξομεταλλική ένωση 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο,  $(\text{NH}_4)_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}$ . Παρασκευάστηκε στο εργαστήριο από τον Δρ. Α. Δούβα και χρησιμοποιήθηκε ως φωτοοξειδωτής.

#### 1.4. Βιομόρια και βιολογικό υλικό (κύτταρα)

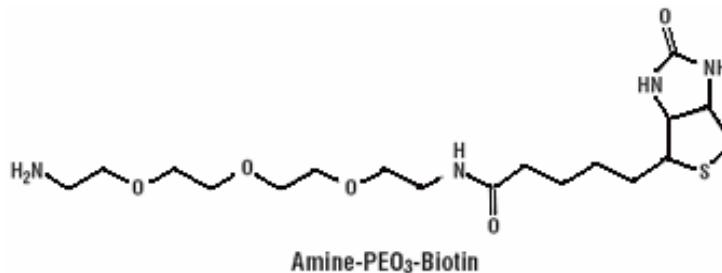
Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν:

- Ο NHS εστέρας της βιοτίνης, 6-βιοτινάμιδο εξανοϊκός θειϊκός ηλεκτριμιδοεστέρας (sulfosuccinimidyl-6-biotin-amido hexanoate, Sulfo-NHS-LC-Biotin) (Σχήμα 81) της Pierce, οποίος θα αναφέρεται επίσης ως θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης ή ως NHS εστέρας της βιοτίνης [203].



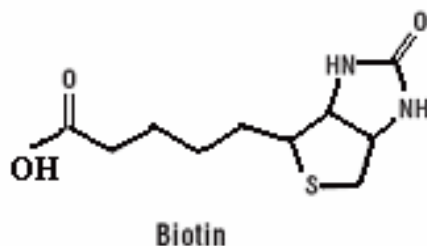
**Σχήμα 81.** Συντακτικός τύπος του 6-βιοτινάμιδο εξανοϊκού θειϊκού ηλεκτριμιδοεστέρα.

- Παράγωγο της βιοτίνης με αμινομάδα, η βιοτινιλο-3,6-διοξοοκτανοδιαμίνη (Biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine, Amine-PEO<sub>3</sub>-Biotin) (Σχήμα 82) της Pierce [203].



**Σχήμα 82.** Συντακτικός τύπος της βιοτινιλο-3,6-διοξοοκτανοδιαμίνης.

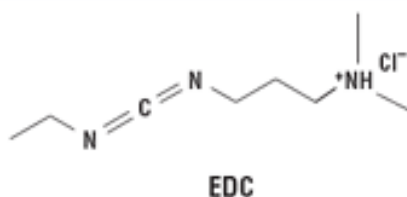
- Βιοτίνη (Biotin) (Σχήμα 83) της Pierce [203].



**Σχήμα 83.** Συντακτικός τύπος της βιοτίνης.

Επίσης, το χλωριούχο άλας του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλοκαρβοδιϊμιδίου) (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide Hydrochloride, EDC) (Σχήμα 84) της Sigma-Aldrich χρησιμοποιήθηκε για την πρόσδεση του

παραγώγου της βιοτίνης με αμινομάδα στο ΑΜΣ του ΑPTES που είχε υποστεί τη λιθογραφία του PHETIMA 2.



**Σχήμα 84.** Συντακτικός τύπος του χλωριούχου άλατος του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο-καρβοδιιμιδίου) (EDC).

- Στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546 της Molecular Probes.
- Καρκινικά κύτταρα της σειράς U-87 MG της Sigma-Aldrich.
- Καρκινικά κύτταρα της σειράς PC-12 της Sigma-Aldrich.
- Θρεπτικό υλικό DMEM της Biochrom. Το θρεπτικό υλικό DMEM περιέχει ανόργανα άλατα, αμινοξέα, βιταμίνες, γλυκόζη και ερυθρό της φαινόλης.
- Εμβρυϊκός ορός βοός της Biochrom.
- Ορός αλόγου της Biochrom.
- L-γλουταμίνη της Biochrom.
- Πενικιλίνη της Biochrom.
- Στρεπτομυκίνη της Biochrom.
- Κολλαγόνο τύπου IV από ανθρώπινο πλακούντα της Sigma-Aldrich
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0.05% / 0.02% σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffered Saline, PBS) της Biochrom.
- Νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve Growth Factor, NGF-β) από αρουραίο της Sigma-Aldrich
- Οροαλβουμίνη βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) της Sigma-Aldrich
- Βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός, η οποία παρασκευάζεται από την Ερευνητρια Β' Βαθμίδας Π. Πέτρου και η διεργασία για την παρασκευή της παρουσιάζεται στο Παράρτημα Ε.3.
- Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού (goat anti-rabbit IgG) επισημασμένο με AlexaFluor® 546 της Sigma-Aldrich
- Αντίσωμα ποντικίου κατά της τουμπουλίνης της Sigma-Aldrich
- Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικίου (goat anti-mouse IgG) επισημασμένο με AlexaFluor® 546 της Sigma-Aldrich
- 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI) της Sigma-Aldrich
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της όξινης ινδιακής πρωτεΐνης των γλοιοκυττάρων (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) επισημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία κυανίνη 3 (Cy3) της Sigma-Aldrich.
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της συσχετιζόμενης με τους μικροσωλινίσκους πρωτεΐνης 2 (Microtubule-associated protein 2, MAP-2) επισημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία Alexa fluor 488 της Sigma-Aldrich.

## 1.5. Διαλύματα

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Τα τετραπολυμερή διαλύθηκαν σε γαλακτικό αιθυλεστέρα με τυπικό ποσοστό κατά βάρος 10%.



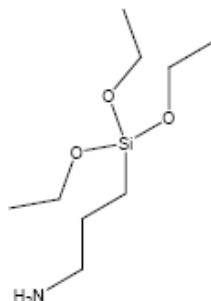
- Οι φωτοπαραγωγοί οξέος διαλύθηκαν στα παρακάτω διαλύματα:
  - Το εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS-SbF<sub>6</sub>) διαλύθηκε σε διάλυμα εποξειδικής ρητίνης με τυπικό ποσοστό 1%, 3% ή 5% του βάρους των στερεών συστατικών του διαλύματος.
  - Το εξαφθοροαντιμονικό άλας του φαινυλθειοφαινυλο διφαινυλοσουλφονίου (PSP-DPS) διαλύθηκε σε διαλύματα των τετραπολυμερών RHETIMA 1 και RHETIMA 2 με τυπικό ποσοστό 30% του βάρους των στερεών συστατικών του διαλύματος.
- Τα φωτοευαίσθητα υλικά πολυ(βινυλικής αλκοόλης)-πολυοξομεταλλικής ένωσης έχουν τις ακόλουθες συστάσεις:
  - PVA 4.3% κ.β. και 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) 14.4% κ.β., τα οποία διαλύονται σε απιονισμένο νερό.
  - PVA 4.3% κ.β. και 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) 0.84% κ.β., τα οποία διαλύονται σε απιονισμένο νερό.
  - PVA 8.2% κ.β. και 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) 14.4% κ.β., τα οποία διαλύονται σε απιονισμένο νερό.
  - PVA 2% κ.β. και 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) 6.26% κ.β., τα οποία διαλύονται σε απιονισμένο νερό.
  - PVA 4.3% κ.β. και 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>) 13% κ.β., τα οποία διαλύονται σε απιονισμένο νερό.
- Διάλυμα μονολαυρικού εστέρα της πολυοξοαιθυλενοσορβιτόλης (Tween 20), το οποίο περιέχει 0.05% v/v Tween το οποίο διαλύεται συνήθως σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων.
- Το τασιενεργό Triton X-100 της Sigma-Aldrich.

## 1.6. Τροποποίηση της επιφάνειας του πυριτίου για την πρόσδεση βιολογικού υλικού

### 1.6.1. Σιλάνια

Η επιφάνεια του πυριτίου τροποποιήθηκε με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (Hexamethyldisilazane, HMDS) της BASF προκειμένου να επιστρωθεί το υμένιο πολυστυρενίου.

Για την προσρόφηση βιομορίων στην επιφάνεια του πυριτίου χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα 2% (v/v) του 3-αμινοπροπυλο-τριαιθοξυσιλανίου (3-Aminopropyl Triethoxy Silane, APTES) (Σχήμα 85) βαθμού καθαρότητας 99% της Aldrich Co.



Σχήμα 85. Συντακτικός τύπος του 3-αμινοπροπυλο-τριαιθοξυσιλανίου (APTES)

### 1.6.2. Εποξειδική ρητίνη EPR

Για την τροποποίηση της επιφάνειας του πυριτίου, έτσι ώστε να είναι εφικτή η χημική πρόσδεση των βιομορίων, χρησιμοποιήθηκε η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR (Epoxy Resist), τα συστατικά της οποίας είναι εποξειδική ρητίνη μέσου

μοριακού βάρους  $M_w=2438$ , η οποία λαμβάνεται κατά τη διαδικασία κλασμάτωσης του πολυμερούς EriKote 164 (βλέπε Κεφάλαιο B.1.6.2.1), και εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου ως φωτοευαίσθητοποιητή. Η εποξειδική ρητίνη διαλύθηκε σε οξικό εστέρα του μεθυλαιθέρα της προπυλενογλυκόλης με τυπικό ποσοστό κατά βάρος 5% ή 19%. Στη συνέχεια προστέθηκε το εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS) με τυπικό ποσοστό 1%, 3% ή 5% κ.β. επί των στερεών.

### **1.6.2.1. Κλασμάτωση του πολυμερούς EriKote 164 για την παρασκευή εποξειδικής ρητίνης EPR**

Η πορεία της κλασμάτωσης για 300 g του πολυμερούς EriKote 164 της Shell, προκειμένου να παρασκευαστεί η εποξειδική ρητίνη EPR, έχει ως εξής [204]:

A. Διάλυση 300 g EriKote 164 σε 1200 mL Μεθυλο-Ισοβουτυλο-Κετόνης (Methyl Isobutyl Ketone, MIBK)

B. Απομάκρυνση του κλάσματος του πολυμερούς μεγάλου μοριακού βάρους (κεφαλή):

1. Το διάλυμα θερμαίνεται στους  $40^{\circ}\text{C}$ .
2. Προστίθενται 842 ml μεθανόλης και παρατηρείται μείωση της θερμοκρασίας κατά περίπου  $10^{\circ}\text{C}$ . Παράγεται υπόλευκο γαλάκτωμα.
3. Το γαλάκτωμα αφήνεται να κατακαθίσει για χρονικό διάστημα 4 ημερών σε σταθερή θερμοκρασία ( $\theta = 20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), ώστε να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των φάσεων.
4. Όταν ο διαχωρισμός φάσεων γίνει ευδιάκριτος, η υγρή φάση μεταφέρεται σε δεύτερο ποτήρι ζέσεως. Δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην αναμιχθεί η στερεή φάση, που είναι το πολυμερές μεγάλου μοριακού βάρους, με την υγρή φάση γιατί παρεμποδίζεται έτσι ο διαχωρισμός.
5. Η στερεή φάση (περιλαμβάνει τα μεγάλα μοριακά βάρη) αφήνεται σε ύαλο ωρολογίου μέχρι να εξατμιστεί ο διαλύτης και ζυγίζεται.

Γ. Απομάκρυνση του κλάσματος του πολυμερούς μικρού μοριακού βάρους:

1. Στην υγρή φάση προστίθενται 1200 ml μεθανόλης. Παράγεται υπόλευκο γαλάκτωμα.
2. Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία και σταθερή θερμοκρασία ( $\theta = 20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) για 4 ημέρες, ώστε να γίνει ο δεύτερος διαχωρισμός φάσεων.
3. Αφού ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των φάσεων, η υγρή φάση αποχωρίζεται σε άλλο ποτήρι ζέσεως.
4. Η υγρή φάση (που είναι το κλάσμα του πολυμερούς μικρού μοριακού βάρους) αφήνεται μέχρι να εξατμιστεί ο διαλύτης.

Δ. Λήψη του κλάσματος μέσου μοριακού βάρους:

1. Επίσης μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των φάσεων η στερεή φάση, η οποία περιλαμβάνει το πολυμερές μέσου μοριακού βάρους, συλλέγεται σε ύαλο ωρολογίου και αφήνεται για να εξατμιστεί ο διαλύτης.
2. Το πολυμερές μέσου μοριακού βάρους ξηραίνεται σε φούρνο στους  $60^{\circ}\text{C}$  υπό κενό, μέχρι σταθερού βάρους, για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη, γιατί αν παραμείνουν έστω και ίχνη του διαλύτη στο στερεό επιδρούν αρνητικά στη λιθογραφική διεργασία.
3. Ζυγίζεται το πολυμερές μέσου μοριακού βάρους που προέκυψε. Συνήθως, το βάρος του είναι περίπου το 50% του αρχικού βάρους.

Το πολυμερές μέσου μοριακού βάρους που λαμβάνεται χρησιμοποιείται για την παρασκευή ρητίνης χημικής ενίσχυσης, η οποία είναι γνωστή ως EPR. Για το σκοπό αυτό διαλύεται το πολυμερές στο διαλύτη οξικό εστέρα του μεθυλαιθέρα της προπυλενογλυκόλης (PGMEA). Στο διάλυμα αυτό προστίθεται ο φωτοευαισθητοποιητής εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS).

## 1.7. Διαλύματα για τον καθαρισμό των δισκίων πυριτίου

Για τον καθαρισμό των δισκίων πυριτίου χρησιμοποιείται το διάλυμα piranha το οποίο παρασκευάζεται από υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ) σε αναλογία κατ' όγκο 50:50. Επίσης, το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την τροποποίηση της επιφάνειας του πυριτίου με υδροξυλομάδες.

## 1.8. Ρυθμιστικά διαλύματα

### 1.8.1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 50mM pH 7.0 και pH 7.4 παρασκευάστηκε από άλατα  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  και  $KH_2PO_4$ .

### 1.8.2. Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων

Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων συγκέντρωσης 50mM pH 9.2 παρασκευάστηκε από άλατα  $NaHCO_3$  και  $Na_2CO_3$ .

## 2. ΟΡΓΑΝΑ

### 2.1. Όργανα φασματοσκοπίας

Η φασματοσκοπία [205] βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τα μόρια ή τα άτομα ενός δείγματος, η οποία περιγράφεται από το νόμο Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = \epsilon c l \quad (7)$$

Όπου A, απορροφητικότητα ή οπτική πυκνότητα

$$T = \frac{I}{I_0} : \text{διαπερατότητα} \quad (8)$$

$I_0$ , ένταση της προσπίπτουσας μονοχρωματικής ακτινοβολίας

I, ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας

$\epsilon$ , συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας

c, η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται

l, το πάχος της κυψελίδας

#### 2.1.1. Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού στηρίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ουσίας, τα οποία υφίστανται ηλεκτρονικές μεταπτώσεις. Τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στα χαμηλότερης ενέργειας δεσμικά μοριακά τροχιακά  $\sigma$  και  $\pi$  ή στα μη δεσμικά τροχιακά  $n$  μεταπηδούν στα υψηλότερης ενέργειας αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά  $\sigma^*$  και  $\pi^*$  [206].

Το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-Vis) που χρησιμοποιήθηκε ήταν το UV-Vis Lambda 40 της Perkin Elmer. Το φασματοφωτόμετρο αυτό είναι διπλής δέσμης και έχει φασματική περιοχή σάρωσης από 190-1100 nm. Το φασματοφωτόμετρο περιλαμβάνει μία λυχνία δευτερίου για την εκπομπή υπεριώδους φωτός και μία λυχνία αλογόνου για την εκπομπή ορατού φωτός, ένα μονοχρωμάτορα, ένα σύστημα κατόπτρων και ένα ανιχνευτή. Το σύστημα κατόπτρων επιτρέπει να φτάσει ένα από τα δύο είδη ακτινοβολίας στο μονοχρωμάτορα, ενώ η αλλαγή στην πηγή της ακτινοβολίας εξασφαλίζεται με περιστροφή του μονοχρωμάτορα. Το φασματοφωτόμετρο συνδέεται με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω του οποίου ρυθμίζονται οι παράμετροι λειτουργίας του και γίνεται η επεξεργασία του σήματος του ανιχνευτή.

Αρχικά, η δέσμη περνά από τον μονοχρωμάτορα στον οποίο ανακλάται και στη συνέχεια οδηγείται σε ένα σύστημα κατόπτρων στο οποίο πάλι ανακλάται. Τελικά, το 50% της ακτινοβολίας φτάνει στο θάλαμο του δείγματος και έπειτα το σήμα ανιχνεύεται από μία φωτοδίοδο, ενώ το υπόλοιπο 50% της ακτινοβολίας φτάνει στο θάλαμο που βρίσκεται το δείγμα αναφοράς και ανιχνεύεται επίσης. Τα δύο αυτά σήματα συγκρίνονται και το αποτέλεσμα καταγράφεται.

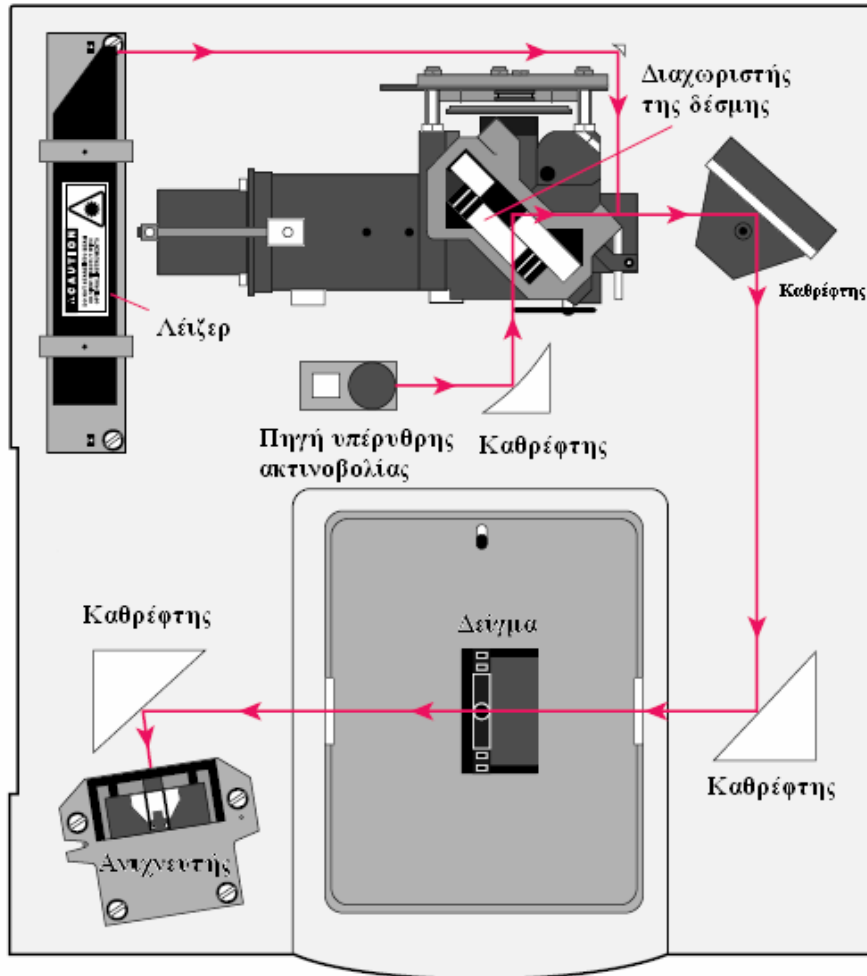
Το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιήθηκε σαν να ήταν μονής δέσμης, δηλαδή στη θέση του δείγματος αναφοράς δεν τοποθετήθηκε τίποτα. Υπάρχει δυνατότητα μετρήσεων οπτικής απορρόφησης σε υγρά και σε στερεά δείγματα. Τα υγρά δείγματα τοποθετούνται σε κυψελίδα από χαλαζία ενώ τα στερεά υμένια επιστρώνονται σε δισκίο από χαλαζία. Αρχικά, τοποθετείται το υπόστρωμα του οποίου λαμβάνεται το φάσμα και στη συνέχεια αφαιρείται από τα φάσματα των δειγμάτων αυτόματα από το όργανο. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στη μελέτη φωτοπολυμερικών υμενίων, έτσι ώστε η δέσμη να διέρχεται κάθετα από αυτό και από το ίδιο σημείο διότι διαφορετικά σημεία στο ίδιο υμένιο μπορεί να έχουν διαφορετικά πάχη, γεγονός που επηρεάζει τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης, η οποία εξαρτάται από το πάχος.

### **2.1.2. Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου**

Το φασματοφωτόμετρο υπερύθρου που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Tensor 27 της Bruker. Το όργανο αυτό είναι μονής δέσμης, έχει φασματική περιοχή σάρωσης 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  και περιλαμβάνει την πηγή ακτινοβολίας και τον ενισχυτή (Σχήμα 86). Το φασματοφωτόμετρο συνδέεται με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω του οποίου ρυθμίζονται οι παράμετροι λειτουργίας του και γίνεται η επεξεργασία και η λήψη του φάσματος.

Υπάρχει δυνατότητα μέτρησης της απορρόφησης, της διαπερατότητας και της ανάκλασης σε στερεά δείγματα. Αρχικά τοποθετείται το υπόστρωμα, το φάσμα του οποίου αφαιρείται αυτόματα από τα φάσματα των δειγμάτων.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία για την παρακολούθηση των μεταβολών στη χημική σύσταση των φωτοευαίσθητων υμενίων κατά τη διάρκεια σταδίων της λιθογραφικής διεργασίας.



Σχήμα 86. Απεικόνιση του εσωτερικού του φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου [207].

## 2.2. Προφιλόμετρο ακίδας

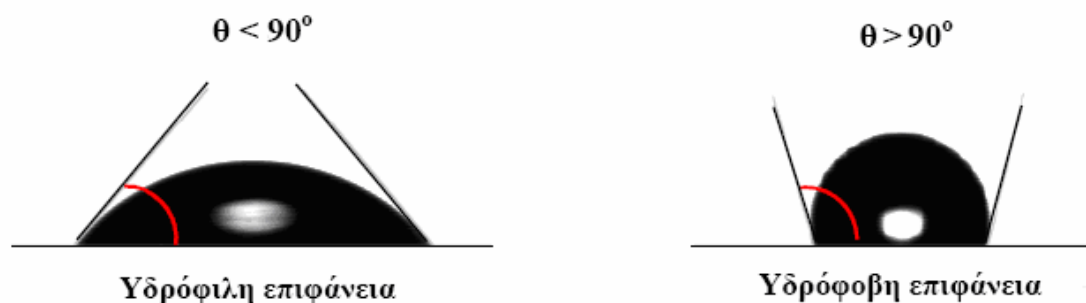
Για τις μετρήσεις του πάχους των φωτοπολυμερικών υμενίων χρησιμοποιήθηκε το προφιλόμετρο ακίδας μοντέλο XP 2<sup>TM</sup> της Ambios Technology Inc. Το προφιλόμετρο αποτελείται από δύο τμήματα, έναν υπολογιστή και το χώρο μέτρησης του δείγματος, ο οποίος περιλαμβάνει την ακίδα μέτρησης, τα αισθητήρια όργανα, την κάμερα και την τράπεζα.

Αρχικά μέσω του υπολογιστή ρυθμίζονται οι παράμετροι της μέτρησης, όπως το μήκος σάρωσης, η ταχύτητα σάρωσης, η μορφή του βήματος και η πίεση της ακίδας. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα στην τράπεζα με την επιφάνειά του απόλυτα κάθετη στον άξονα της ακίδας. Για την μέτρηση του πάχους είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός βήματος. Συνήθως, για τη μέτρηση του πάχους ενός φωτοπολυμερικού υμενίου δημιουργείται μια χαραγή μέχρι το υπόστρωμα και ακολούθως η ακίδα σαρώνει την επιφάνεια σε διεύθυνση κάθετη στη χαραγή. Τέλος, μέσω του υπολογιστή γίνεται η επεξεργασία του γραφήματος μετά τη σάρωση και η εύρεση του πάχους του δείγματος μέσω της διαφοράς ύψους μεταξύ του υποστρώματος και του υμενίου.

## 2.3. Όργανο μέτρησης της γωνίας επαφής

Η γωνία επαφής είναι μία πρώτη εκτίμηση της υδροφιλικότητας ή της υδροφοβικότητας ενός υλικού. Συγκεκριμένα η επιφάνεια των φωτοευαίσθητων υμενίων διαβρέχεται από μία σταγόνα νερού και στη συνέχεια προσδιορίζεται η

γωνία  $\theta$  που σχηματίζει η σταγόνα με την υπό μελέτη επιφάνεια. Όταν  $\theta < 90^\circ$  η επιφάνεια χαρακτηρίζεται υδρόφιλη, ενώ όταν  $\theta > 90^\circ$  η επιφάνεια χαρακτηρίζεται υδρόφοβη (Σχήμα 87).



Σχήμα 87. Σχηματική απεικόνιση των γωνιών επαφής σε υδρόφιλες και υδρόφοβες επιφάνειες.

Το όργανο μέτρησης της γωνίας επαφής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το Digidrop Contact Angle Measurement System της GBX.

## 2.4. Μικροσκόπιο φθορισμού με ανάκλαση

Το μικροσκόπιο φθορισμού με ανάκλαση χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των βιομορίων επισημασμένων με ιχνηθέτες φθορισμού. Οι ιχνηθέτες φθορισμού είναι οργανικά μόρια και έχουν χαρακτηριστικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής φθορισμού. Στο μικροσκόπιο φθορισμού, το δείγμα διεγείρεται από ακτινοβολία η οποία εκπέμπεται μέσω μιας λυχνίας ατμών Hg μικρού τόξου ισχύος 50W και διέρχεται μέσα από κατάλληλο φίλτρο για να απομονωθεί μέρος του φάσματος που ταιριάζει με το φάσμα απορρόφησης του φθορίζοντος ιχνηθέτη. Τέλος, ανιχνεύεται η εκπομπή της φθορίζουσας ουσίας αφού διαχωριστεί από τη δέσμη διέγερσης μέσω κατάλληλου φίλτρου.

Όταν προσπέσει στον ιχνηθέτη φθορισμού φως το απορροφά και μεταβαίνει στη διεγερμένη κατάσταση. Αποδιεγειρόμενο το μόριο επανέρχεται στη βασική του κατάσταση εκπέμποντας ένα τμήμα της ενέργειας με τη μορφή φωτονίων (φθορισμός). Ένα μέρος της αρχικής ενέργειας χάνεται υπό τη μορφή δονήσεων πριν την εκπομπή του φθορισμού και για αυτό το εκπεμπόμενο φως έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος από το μήκος κύματος διέγερσης. Το φάσμα εκπομπής της χρωμοφόρας ομάδας είναι πάντα μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης. Η μετατόπιση αυτή καθιστά δυνατό το διαχωρισμό του διεγείροντος από το εκπεμπόμενο φως με τη χρήση οπτικών φίλτρων.

Το μικροσκόπιο φθορισμού με ανάκλαση που χρησιμοποιήθηκε είναι η συσκευή Axioskop 2 Plus της Carl Zeiss, η οποία παρουσιάζει δυνατότητα χρήσης πέντε διαφορετικών φίλτρων διέγερσης και πέντε διαφορετικών φίλτρων εκπομπής. Οι φωτογραφίες από το μικροσκόπιο φθορισμού λαμβάνονται με τη βοήθεια ψηφιακής μηχανής. Στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία των φωτογραφιών μέσω του προγράμματος Image-Pro Plus.

## 2.5. Ιξωδόμετρο

Για τη μέτρηση του ιξώδους των διαλυμάτων PVA και PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος χρησιμοποιήθηκε το ιξωδόμετρο Cannon-Fenske opaque reverse flow και οι τιμές ιξώδους μετρήθηκαν σε θερμοκρασία  $40^\circ\text{C}$ . Οι μετρήσεις έγιναν στην εταιρεία SpectrumLabs, η οποία βρίσκεται στον Πειραιά.

## 2.6. Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στη λιθογραφική διεργασία

### 2.6.1. Μηχανικός περιστροφικός επιστρωτής

Ο μηχανικός περιστροφικός επιστρωτής, της εταιρείας Headway Research Inc., χρησιμοποιείται για την επίστρωση των φωτοπολυμερικών υμενίων. Το δισκίο πυριτίου σταθεροποιείται στη κεφαλή του επιστρωτή με υποπίεση, η οποία δημιουργείται με μηχανική αντλία κενού. Στη συνέχεια ρυθμίζονται η ταχύτητα και ο χρόνος περιστροφής της κεφαλής. Οι δύο αυτές παράμετροι καθορίζουν το πάχος του φωτοευαίσθητου υμενίου που θα σχηματιστεί. Έπειτα μεταφέρεται με σταγονόμετρο διάλυμα πολυμερούς στο δισκίο πυριτίου, μέχρι να καλυφθούν τα  $\frac{3}{4}$  της επιφάνειάς του. Κατά την έγχυση του διαλύματος του πολυμερούς πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην σχηματιστούν φυσαλίδες, όπως επίσης να μην υπάρχουν σωματίδια σκόνης πάνω στο δισκίο, γιατί οι παράγοντες αυτοί υποβαθμίζουν την ποιότητα του υμενίου που θα επιστρωθεί.

### 2.6.2. Συστήματα έκθεσης

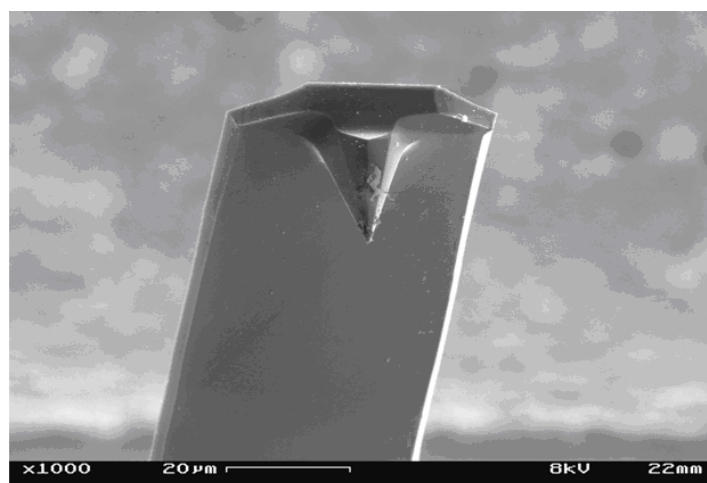
Οι εκθέσεις των φωτοπολυμερικών υμενίων έγιναν σε λυχνία εκκένωσης υδραργύρου-ξένου της Oriel, σε λάμπα υδραργύρου του ευθυγραμμιστή масκών MJB3 Mask Aligner και του ευθυγραμμιστή масκών MA6 της Karl Suss.

### 2.6.3. Θερμαινόμενες πλάκες

Οι θερμαινόμενες πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι της εταιρείας Bioline Scientific.

## 2.7. Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων

Το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscope, AFM) αποτελείται από έναν εύκαμπτο βραχίονα (cantilever) κατασκευασμένο, συνήθως, από πυρίτιο ή νιτρίδιο του πυριτίου, ο οποίος διαθέτει μία αιχμηρή άκρη (ακίδα) με ακτίνα καμπυλότητας της τάξης μερικών nm (Σχήμα 88).



**Σχήμα 88.** Εικόνα ακίδας AFM από μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (Scanning Electron Microscope, SEM) [208].

Ο εύκαμπτος βραχίονας σαρώνει το δείγμα ενώ καταγράφεται η εκτροπή του ή το πλάτος ταλάντωσης. Οι μετρήσεις αυτές γίνονται από ένα οπτικό σύστημα

παρακολούθησης, το οποίο περιλαμβάνει μία φωτοδίοδο και ένα λέιζερ. Συγκεκριμένα η ακτίνα λέιζερ προσπίπτει στο βραχίονα, ανακλάται και ανιχνεύεται από τη φωτοδίοδο. Η αρχή λειτουργίας του AFM στηρίζεται στην καταγραφή των αποκλίσεων της ακίδας, οι οποίες προκαλούνται από την τοπογραφία της επιφάνειας του δείγματος. Οι αποκλίσεις αυτές ανιχνεύονται και καταγράφονται υπό μορφή τάσης στη φωτοδίοδο. Αν η ακίδα σάρωνε την επιφάνεια σε σταθερό ύψος τότε θα υπήρχε πιθανότητα να προκαλέσει ζημιά στο δείγμα. Γι' αυτό το λόγο, συνήθως, υπάρχει ένα σύστημα ανάδρασης.

Ένα τυπικό παράδειγμα μέτρησης με AFM περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια. Αρχικά ο χρήστης καθορίζει μία παράμετρο (setpoint), η οποία σχετίζεται με τη δύναμη μεταξύ της ακίδας και του δείγματος. Για παράδειγμα μπορεί να καθορίσει σταθερή τιμή για την καταγραφόμενη τάση στη φωτοδίοδο. Η τιμή της τάσης κατά τη διάρκεια της σάρωσης μεταβάλλεται εξαιτίας της τοπογραφίας της επιφάνειας. Ο χρήστης επιβάλλοντας να παραμείνει σταθερή η τιμή της τάσης, επιβάλλει στη δύναμη μεταξύ δείγματος και ακίδας να διατηρείται σταθερή μέσω εκκίνησης της λειτουργίας του συστήματος ανάδρασης. Η καταγραφόμενη τάση οδηγείται σε έναν ελεγκτή και αν αυτή είναι διαφορετική από την καθορισμένη τάση τότε ο ελεγκτής επικοινωνεί με τον πιεζοκρύσταλλο, ο οποίος μετακινείται ανάλογα κατά τον άξονα z ώστε να επαναφέρει την τιμή της τάσης στην προκαθορισμένη τιμή. Η μετατόπιση του πιεζοκρυσταλλού στη θέση x,y καταγράφεται με αποτέλεσμα να λαμβάνεται η τοπογραφία της επιφάνειας του δείγματος (x,y,z).

Το AFM παρέχει τη δυνατότητα της απεικόνισης της επιφάνειας μέσω διαφορετικών μεθόδων. Οι πιο σημαντικές είναι η μέθοδος με συνεχή επαφή (contact mode), κατά την οποία η ακίδα είναι σε επαφή με το δείγμα όταν πραγματοποιείται η μέτρηση (σάρωση της επιφάνειας) και η μέθοδος με περιοδική επαφή (tapping mode), όπου κατά τη διάρκεια της μέτρησης η ακίδα χτυπά απαλά την επιφάνεια μέσα από δονήσεις που προκαλεί ο βραχίονας σε συγκεκριμένη συχνότητα. Η πρώτη μέθοδος εφαρμόζεται σε σκληρά και ανθεκτικά υλικά, ενώ η δεύτερη μέθοδος εφαρμόζεται σε υλικά με μαλακές επιφάνειες όπως είναι τα πολυμερικά υλικά.

Στη μέθοδο επαφής μέσω περιοδικής ταλάντωσης της ακίδας το όργανο διατηρεί σταθερό το πλάτος της ταλάντωσης (setpoint). Αναλυτικότερα η τοπογραφία της επιφάνειας του δείγματος προκαλεί αλλαγή στο πλάτος της ταλάντωσης του εύκαμπτου βραχίονα. Η μεταβολή αυτή ανιχνεύεται μέσω της δέσμης του laser που ανακλάται από τον εύκαμπτο βραχίονα στη φωτοδίοδο. Στη συνέχεια ο πιεζοκρύσταλλος μέσω του κυκλώματος ανάδρασης μετακινείται ανάλογα κατά τον άξονα z ώστε να επαναφέρει το πλάτος ταλάντωσης του βραχίονα στην τιμή που έχει καθοριστεί (setpoint).

Το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο CP-II της εταιρείας Veeco.

Από την επεξεργασία των εικόνων AFM υπολογίστηκε η μέση τετραγωνική ρίζα της τραχύτητα  $R_q$  (root mean square roughness), η οποία ορίζεται από τον παρακάτω τύπο [209]:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L z^2(x) dx} \quad (9)$$

Όπου L, μήκος αξιολόγησης

z, ύψος

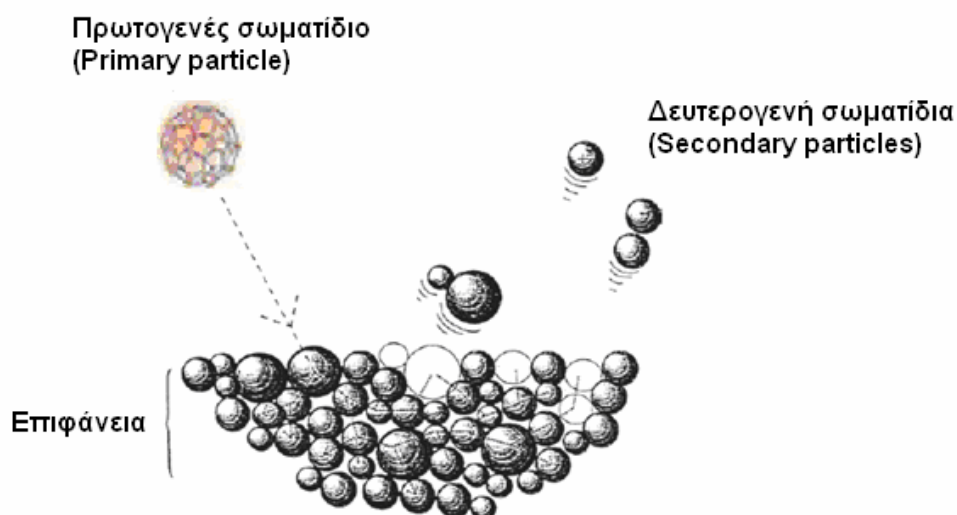
x, απόσταση μέτρησης (distance along measurement)



## 2.8. Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης

Η Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy, ToF-SIMS) στηρίζεται στο βομβαρδισμό των δειγμάτων με πρωτογενή ιόντα. Ο βομβαρδισμός του δείγματος έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων από τα δείγματα. Στη συνέχεια τα ιόντα που απελευθερώνονται από την επιφάνεια του δείγματος ταυτοποιούνται μέσω μετρήσεων του χρόνου άφιξής τους στον ανιχνευτή καθώς η ταχύτητα και ο χρόνος πτήσης εξαρτώνται από το λόγο μάζας/φορτίου των ιόντων του δείγματος.

Αναλυτικότερα η Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης (ToF-SIMS) ανήκει στις τεχνικές Φασματοσκοπίας Μάζας Δευτερογενών Ιόντων (Secondary Ion Mass Spectroscopy, SIMS). Οι τεχνικές αυτές αφορούν την εκπομπή ιοντισμένων σωματιδίων, τα οποία απελευθερώνονται όταν μία επιφάνεια, συνήθως στερεή επιφάνεια, βομβαρδίζεται με ενεργειακά πρωτογενή σωματίδια. Όταν μία δέσμη ιόντων ή ουδέτερων σωματιδίων βομβαρδίζει μία επιφάνεια τότε η ενέργεια του σωματιδίου μεταφέρεται στο άτομο της στερεής επιφάνειας μέσω σύγκρουσης. Ορισμένες συγκρούσεις έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ηλεκτρονίων, ουδέτερων ατόμων ή μορίων, ατομικών ή ιοντικών συμπλόκων (atomic or cluster ions) (Σχήμα 89). Ορισμένα από αυτά είναι ιοντισμένα λόγω της απελευθέρωσής τους από την επιφάνεια.



**Σχήμα 89.** Σχηματική απεικόνιση της διεργασίας της Φασματοσκοπίας Μάζας Δευτερογενών Ιόντων [210].

Οι μετρήσεις δειγμάτων εποξειδικής ρητίνης και δειγμάτων εποξειδικής ρητίνης, στα οποία είχε ακινητοποιηθεί ο θεϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης, με Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης, πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Φυσικής του Πανεπιστημίου Jagiellonian στην Κρακοβία της Πολωνίας από τον Καθηγητή Andrzej Budkowski. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο όργανο TOF.SIMS 5. Τα πρωτογενή ιόντα ήταν τα  $\text{Bi}_3^+$ . Στα δείγματα μελετήθηκε επιφάνεια  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ , η οποία βομβαρδίστηκε με  $3.5 \times 10^{12}$  ιόντα/ $\text{cm}^2$ .

## **3. ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ**

### **3.1. Λιθογραφική διεργασία**

#### **3.1.1. Επίστρωση**

Η επίστρωση γίνεται με χρήση του μηχανικού περιστροφικού επιστρωτή, ο οποίος προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Β.2.6.1. Οι επιστρώσεις των υμενίων έγιναν σε δισκία πυριτίου 3 in ή 4 in ή σε κομμάτια πυριτίου καθώς και σε δισκία χαλαζία προκειμένου να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης του υμενίου του φωτοπολυμερούς με το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού. Πολλές φορές το διάλυμα διηθείται *in situ* κατά την απόχυση του στο δισκίο, για να απαλλαγεί από σωματίδια σκόνης ή από συσσωματώματα του πολυμερούς.

#### **3.1.2. Θερμική κατεργασία μετά την επίστρωση**

Η θέρμανση μετά την επίστρωση (Post Applied Bake, PAB) γίνεται πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα, όπου το δισκίο σκεπάζεται με γυάλινο δοχείο για να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία του περιβάλλοντος αέρα και να αποφεύγεται η επαφή του με ακαθαρσίες ή υγρασία της ατμόσφαιρας. Η θέρμανση έχει ως σκοπό την απομάκρυνση του εναπομείναντος διαλύτη, την ελάττωση του ελεύθερου όγκου, που δημιουργήθηκε στο στάδιο της επίστρωσης λόγω της απότομης απομάκρυνσης του διαλύτη, καθώς και την επαναδιάταξη των πολυμερικών αλυσίδων. Η θερμοκρασία PAB εξαρτάται από το είδος του πολυμερικού υλικού και το υλικό του υποστρώματος. Η θερμοκρασία αυτή πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (Glass Transition Temperature,  $T_g$ ) του φωτοπολυμερικού υλικού αλλά να μην υπερβαίνει τη θερμοκρασία αποικοδόμησης του υλικού (Degradation Temperature,  $T_d$ ) διότι σε μεγαλύτερη θερμοκρασία το υλικό θα διασπώταν ολόκληρο θερμικά και όχι φωτοχημικά στις επιλεγμένες περιοχές όπως είναι επιθυμητό.

#### **3.1.3. Έκθεση**

Η έκθεση (Exposure) του φωτοπολυμερικού υμενίου πραγματοποιείται με κατάλληλη πηγή σε συγκεκριμένο μήκος κύματος ή περιοχή μήκους κύματος. Επομένως, αρχικά επιλέγεται η κατάλληλη πηγή έκθεσης και αν είναι αναγκαίο με τη βοήθεια φίλτρων αποκοπής ή μονοχρωματικής ακτινοβολίας περιορίζεται η ακτινοβολία της πηγής σε μια μικρή περιοχή ή σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος αντίστοιχα. Η δόση έκθεσης του φωτοπολυμερικού υμενίου εξαρτάται από την ισχύ της πηγής έκθεσης και το χρόνο έκθεσης. Για την έκθεση των φωτοπολυμερικών υμενίων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής φίλτρα:

- Φίλτρο στα 249 nm με στενή ζώνη φάσματος (10 nm εύρος ζώνης στο ήμισυ του ύψους της κορυφής του φάσματός του),
- Φίλτρο στα 254 nm με στενή ζώνη φάσματος (50 nm εύρος ζώνης στο ήμισυ του ύψους της κορυφής του φάσματός του)

#### **3.1.4. Θερμική κατεργασία μετά την έκθεση**

Η θέρμανση μετά την έκθεση (Post Exposure Bake, PEB) είναι απαραίτητη στα υλικά μηχανισμού χημικής ενίσχυσης για τη διάχυση του οξέος και για την εκκίνηση της αντίδρασης μεταξύ του οξέος και των προστατευμένων ομάδων του πολυμερούς. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από το υλικό που χρησιμοποιείται και από την εφαρμογή για την οποία προορίζεται.

### 3.1.5. Εμφάνιση

Στο στάδιο της εμφάνισης (Development) πραγματοποιείται η διαλυτοποίηση των εκτεθειμένων περιοχών στην περίπτωση λιθογραφίας θετικού τόνου ή των ανέκθετων περιοχών στην περίπτωση λιθογραφίας αρνητικού τόνου.

### 3.2. Διεργασία τροποποίησης της επιφάνειας του πυριτίου με APTES

Αρχικά το δισκίο πυριτίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα Piranha ( $H_2SO_4:H_2O_2$  50:50 (% v/v)) για 20 min με σκοπό τη δημιουργία υδροξυλομάδων στην επιφάνεια του. Στη συνέχεια το υπόστρωμα ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και στεγνώνεται σε ρεύμα  $N_2$ . Έπειτα εμβαπτίζεται για 20 min σε διάλυμα του 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιου (Aminopropyl triethoxy silane, APTES) σε απιονισμένο νερό. Το 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο αντιδρά με τις υδροξυλομάδες που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια του πυριτίου όπως παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο A.1.1.1. στο Σχήμα 5. Στη συνέχεια το υπόστρωμα ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και στεγνώνεται σε ρεύμα  $N_2$ . Ακολουθεί θέρμανση στους  $120^\circ C$  για 20 min με σκοπό να σταθεροποιηθούν οι δεσμοί που έχουν δημιουργηθεί. Έπειτα το υπόστρωμα εμβαπτίζεται σε απιονισμένο νερό και τοποθετείται για 1 min σε υπέρηχους. Οι υπέρηχοι έχουν ως σκοπό την απομάκρυνση του APTES που δεν έχει προσδεθεί ομοιοπολικά στην επιφάνεια.

### 3.3. Διεργασία για την ακινητοποίηση της βιοτίνης και των παραγώγων της

Αρχικά η βιοτίνη και τα παράγωγά της διαλύονται σε DMSO και έπειτα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.0 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mg/mL. Στη συνέχεια τα σχηματοποιημένα υμένια εμβαπτίζονται για 1 h σε διαλύματα της βιοτίνης και των παραγώγων της. Ακολούθως, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός (BSA), το οποίο περιέχει οροαλβουμίνη βοός συγκέντρωσης 10 g/L σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.0. Μετά από 1 h τα υμένια ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα  $N_2$ . Στη συνέχεια εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5  $\mu L/mL$  επισημασμένης με Alexa Fluor® 546 διαλυμένης σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός. Τέλος, τα υμένια ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο περιέχει 0.05% Tween και τέλος ξεπλένονται με απιονισμένο νερό.

Η ανίχνευση των ακινητοποιημένων και επισημασμένων με Alexa Fluor βιομορίων έγινε με το μικροσκόπιο φθορισμού με ανάκλαση (Κεφάλαιο B.2.4). Οι φωτογραφίες από το μικροσκόπιο φθορισμού λαμβάνονται με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Sony Cyber-shot digital camera). Στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία των φωτογραφιών μέσω του προγράμματος Image-Pro Plus (Media Cybernetics Co.). Ο καθαρός φθορισμός υπολογίζεται αφού αφαιρεθεί το σήμα από το υπόβαθρο.

### 3.4. Διεργασία για την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός

Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός παρασκευάζεται από την Ερευνήτρια Β' Βαθμίδας Π. Πέτρου και η διεργασία για την παρασκευή της παρουσιάζεται στο Παράρτημα E.3.

Τα υμένα εμβαπτίζονται σε διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός διαφόρων συγκεντρώσεων (σε κάθε πείραμα αναφέρεται η συγκέντρωση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός, μία τυπική συγκέντρωση είναι 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05M και pH 7.4). Στη συνέχεια τα υμένα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός, το οποίο περιέχει οροαλβουμίνη βοός συγκέντρωσης 10 g/L σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05M και pH 7.4. Μετά από 1 h τα υμένα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Ακολούθως εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης (τυπική συγκέντρωση 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) επισημασμένης με Alexa Fluor® 546 διαλυμένης σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός. Τέλος, τα υμένα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Ο καθαρός φθορισμός υπολογίζεται αφού έχει αφαιρεθεί το σήμα από το υπόβαθρο.

### **3.5. Διεργασία για την ακινητοποίηση αντισώματος αιγός κατά των $\gamma$ -σφαιρινών κουνελιού επισημασμένου με φθορίζουσα ουσία**

Οι λιθογραφημένες επιφάνειες εμβαπτίζονται σε διάλυμα αντισώματος αιγός κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών κουνελιού επισημασμένου με Alexa Fluor® 546 τελικής συγκέντρωσης 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για διαφορετικούς χρόνους επώασης. Τα υμένα στη συνέχεια ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05 M και pH 9.2 τρεις φορές και ακολούθως ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ .

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζονται σε τρεις ενότητες. Στην πρώτη ενότητα παρουσιάζονται φωτοευαίσθητα πολυμερικά υμένια για τη χημική πρόσδεση βιομορίων (Κεφάλαιο Γ1). Στη δεύτερη ενότητα παρουσιάζονται φωτοευαίσθητα πολυμερικά υμένια για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών (Κεφάλαιο Γ2). Τέλος, στην τρίτη ενότητα παρουσιάζεται φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο για τη σχηματοποίηση κυττάρων (Κεφάλαιο Γ3). Προκειμένου να ενσωματωθούν οι προτεινόμενες μέθοδοι σχηματοποίησης βιολογικού υλικού στην κατασκευή βιο-μικροηλεκτρομηχανικών διατάξεων, επιλέχθηκε το πυρίτιο ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη όλων των διεργασιών σχηματοποίησης βιολογικού υλικού, καθώς το πυρίτιο είναι το υπόστρωμα που εφαρμόζεται ευρέως στη Μικροηλεκτρονική για την κατασκευή μικροηλεκτρομηχανικών διατάξεων.

### 1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΧΡΗΣΗΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΥΜΕΝΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

Η χημική πρόσδεση των πρωτεϊνών προτιμάται γενικά έναντι της φυσικής προσρόφησης καθώς, η φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών σε επιφάνειες προκαλεί συνήθως τη μερική μετουσίωσή τους [211]. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών είναι δύσκολο να προβλεφθούν και δεν υπάρχει έλεγχος στον προσανατολισμό των πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα το στρώμα των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών δεν είναι σταθερό, ειδικά σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Επίσης τα πεπτίδια και τα μικρά μόρια δεν μπορούν να ακινητοποιηθούν μέσω φυσικής προσρόφησης [212]. Γι' αυτούς τους λόγους απαιτείται ο σωστός σχεδιασμός της επιφάνειας προκειμένου η πρωτεΐνη να διατηρήσει την ενεργότητά της και μετά την ακινητοποίησή της στην επιφάνεια [213]. Στην πρώτη ενότητα της Διδακτορικής Διατριβής μελετήθηκε η δυνατότητα χρήσης φωτοευαίσθητων πολυμερικών υμενίων για τη χημική πρόσδεση βιομορίων.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου επιλέχθηκε να ακινητοποιηθεί ένα μικρό βιομόριο προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το ενδεχόμενο φυσικής προσρόφησης του στη στερεή επιφάνεια. Συγκεκριμένα το βιομόριο που επιλέχθηκε να ακινητοποιηθεί είναι η βιοτίνη. Η πρόσδεση της βιοτίνης σε διάφορα υποστρώματα είναι σημαντική, καθώς η ακινητοποιημένη βιοτίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση οποιασδήποτε βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης αξιοποιώντας τον ισχυρό δεσμό βιοτίνης/στρεπταβιδίνης. Συγκεκριμένα, η στρεπταβιδίνη μπορεί να προσδεθεί στην ακινητοποιημένη βιοτίνη με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ακινητοποίηση οποιασδήποτε βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης πάνω στη στρεπταβιδίνη.

Προκειμένου να επιτευχθεί η σχηματοποίηση της βιοτίνης με χρήση φωτοευαίσθητων πολυμερικών υμενίων ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι. Στην πρώτη μέθοδο επιλέχθηκε η διεργασία της αποκόλλησης (lift-off), καθώς αυτή η διεργασία χρησιμοποιείται ευρέως για την επιλεκτική πρόσδεση βιολογικού υλικού (βλέπε Κεφάλαιο Α.3.1.1.), ενώ στη δεύτερη μέθοδο η βιοτίνη ακινητοποιείται πάνω στο σχηματοποιημένο φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο.

## 1.1. Καθοδήγηση της χημικής πρόσδεσης της βιοτίνης μέσω φωτολιθογραφικής διεργασίας αποκόλλησης (lift-off)

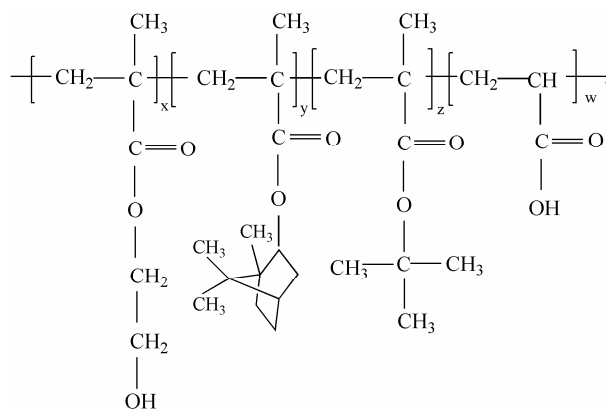
### 1.1.1. Επιλογή συστήματος

Αρχικά για τη σχηματοποίηση της βιοτίνης διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της διεργασίας της αποκόλλησης (lift-off) (Σχήμα 52). Σε αυτή τη διεργασία το φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο κατευθύνει την πρόσδεση της βιοτίνης στις επιθυμητές περιοχές και στο τέλος απομακρύνεται. Η διεργασία της αποκόλλησης τροποποιήθηκε έτσι ώστε να είναι εφικτή η ακινητοποίηση και η σχηματοποίηση της βιοτίνης στην επιφάνεια του πυριτίου. Καθώς η πρόσδεση της βιοτίνης στο πυρίτιο είναι αδύνατη, επειδή αυτό δεν διαθέτει λειτουργικές ομάδες στις οποίες η βιοτίνη να μπορεί να προσδεθεί χημικά, ήταν απαραίτητη η τροποποίηση της επιφάνεια του πυριτίου. Για να επιτευχθεί η χημική ρόφηση της βιοτίνης η επιφάνεια του πυριτίου μπορεί να τροποποιηθεί μέσω Αυτοοργανωμένων Μονομοριακών Στρωμάτων (ΑΜΣ), πολυμερικών υμενίων ή πολυμερικών ψηκτρών, όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Α.1.1 του Θεωρητικού Μέρους.

Τα σιλάνια χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς ανθίστανται στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται για να απομακρύνουν το φωτοευαίσθητο υμένιο, δεν μεταβάλλουν τις οπτικές ιδιότητες των υποστρωμάτων, μπορούν να δημιουργήσουν ένα σταθερό δεσμό μεταξύ του υποστρώματος και της πρωτεΐνης και μπορούν να προσδεθούν σε πληθώρα υποστρωμάτων ακόμα και σε μεταλλικά υποστρώματα, στα οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν ηλεκτρικές μετρήσεις [214].

Στην προτεινόμενη διεργασία χρησιμοποιήθηκε το 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (3-aminopropyl triethoxysilane, APTES). Επιλέχθηκε η τροποποίηση του πυριτίου να γίνει με ΑΜΣ αμινοσιλανίου καθώς οι τερματικές αμίνες μπορούν να αντιδράσουν με πολλές ομάδες. Η αμινομάδα μπορεί να αντιδράσει με τις καρβοξυλομάδες του ασπαρτικού οξέος και του γλουταμικού οξέος με αποτέλεσμα να προσδεθεί χημικά μία πρωτεΐνη (βλέπε Κεφάλαιο Α.1.3.1) ή μπορεί να τροποποιηθεί κατάλληλα έτσι ώστε να αντιδράσει και με άλλα αμινοξέα. Για παράδειγμα ο Yamaguchi και η ομάδα του [215] χρησιμοποιεί μία διεργασία για την τροποποίηση των αμινομάδων του APTES. Αρχικά, οι αμινομάδες μετατρέπονται σε καρβοξυλομάδες με την προσθήκη γλουταρικού ανυδρίτη (glutaric anhydride). Έπειτα οι καρβοξυλομάδες εμβαπτίζονται σε διάλυμα Ν-υδροξυηλεκτριμιδίου (N-hydroxysuccinimide, NHS) και δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου (dicyclohexylcarbodiimide) με αποτέλεσμα να μετατρέπονται οι καρβοξυλομάδες σε ομάδες Ν-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα (N-hydroxysuccinimide ester group), οι οποίες αντιδρούν με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών [215].

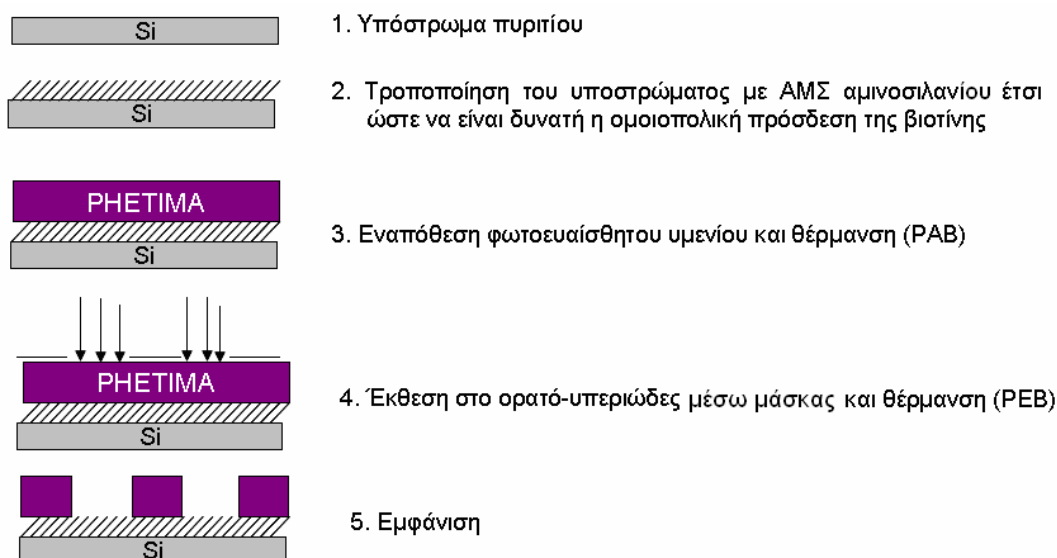
Στη συνέχεια για την επίτευξη της καθοδήγησης της πρόσδεσης της βιοτίνης ήταν απαραίτητη η επιλογή ενός φωτοευαίσθητου υλικού. Χρησιμοποιήθηκαν φωτοευαίσθητα υλικά θετικού τόνου, τα οποία περιείχαν ακρυλικό τετραπολυμερές και φωτο-παραγωγό οξέος. Τα ακρυλικά τετραπολυμερή (Σχήμα 90) αποτελούνται από μεθακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα (t-butyl methacrylate, TBMA), μεθακρυλικό 2-υδροξυαιθυλεστέρα (2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA), μεθακρυλικό ισοβορνυλικό εστέρα (isobornyl methacrylate, IBMA) και ακρυλικό οξύ (acrylic acid, AA). Αυτά τα ακρυλικά τετραπολυμερή είναι γνωστά με την ονομασία PHETIMA, που είναι το ακρωνύμιο της αγγλικής ονομασίας των μονομερών από τα οποία αποτελούνται [177].



**Σχήμα 90.** Δομική μονάδα των φωτοευαίσθητων ακρυλικών τετραπολυμερών [πολυ(μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας-co-μεθακρυλικός ισοβορνυλικός εστέρας-co-μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας-co-ακρυλικό οξύ, PHETIMA)].

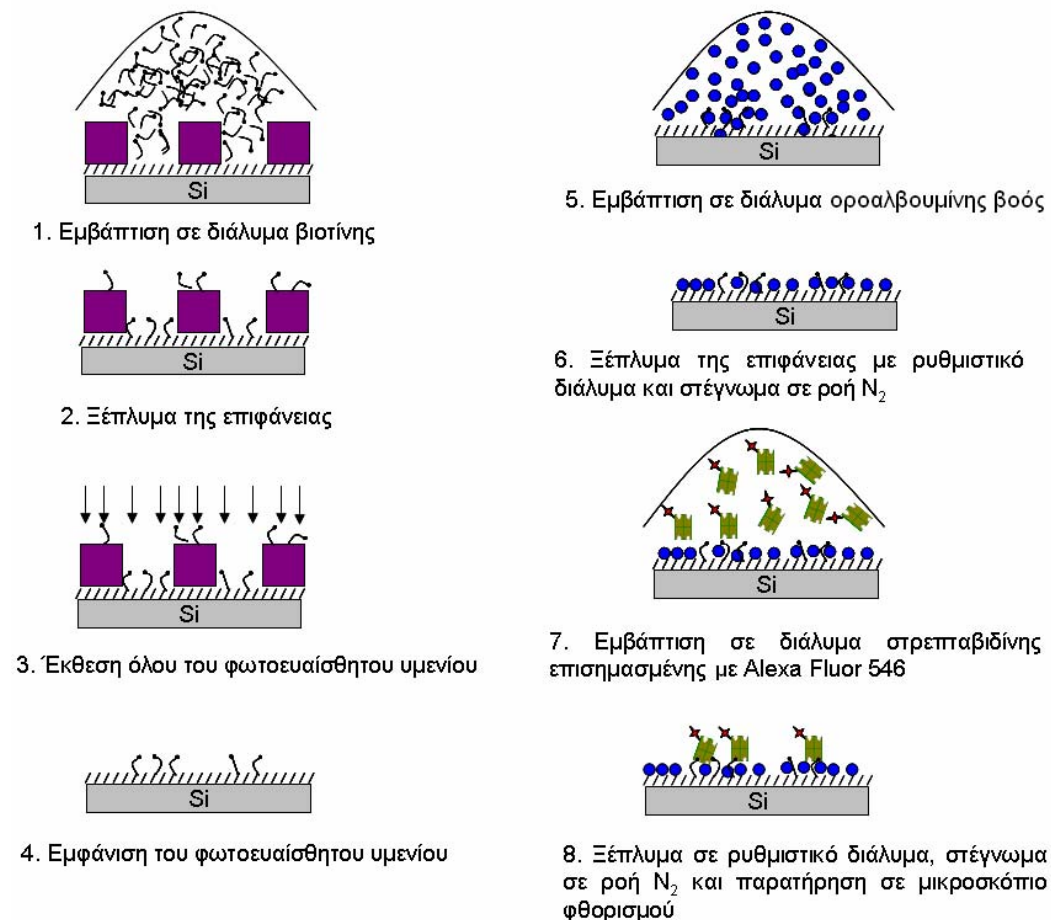
Στον μεθακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα οφείλεται η αλλαγή της διαλυτότητας της πολυμερικής μήτρας μετά από έκθεση στο φως μέσω της αποπροστασίας του εστέρα, η οποία καταλύεται από το φωτοπαραγόμενο οξύ [178]. Ο μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας και το ακρυλικό οξύ καθιστά το υμένιο υδρόφιλο, έτσι ώστε να είναι δυνατή η εμφάνισή του σε αραιό διάλυμα βάσης. Τέλος, ο μεθακρυλικός ισοβορνυλικός εστέρας εξασφαλίζει την ανθεκτικότητα [201] του μη εκτεθειμένου στο φως υμενίου στο διάλυμα του εμφανιστή, καθώς ήταν επιθυμητό αυτό να παραμένει ανεπηρέαστο επειδή τα υλικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση πολλών λιθογραφικών κύκλων [176]. Τα τετραπολυμερή είχαν παρασκευαστεί με πολυμερισμό ελευθέρων ριζών από τον Δρ. Διακουμάκο [174, 175, 202]. Η διεργασία παρασκευής τους παρουσιάζεται στο Παράρτημα Ε.1. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο τετραπολυμερή, το PHETIMA 1 και το PHETIMA 2, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το ποσοστό σύστασης των μονομερών, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 του Κεφαλαίου Β.1.2.

Συνολικά, η προτεινόμενη μέθοδος εμφανίζεται στα Σχήματα 91 και 92. Αρχικά μετά την τροποποίηση της επιφάνειας με το ΑΜΣ αμινοσιλανίου, ακολουθεί η λιθογραφία θετικού τόνου του φωτοευαίσθητου υμενίου (Σχήμα 91).



**Σχήμα 91.** Λιθογραφική διεργασία θετικού τόνου του φωτοευαίσθητου υμενίου πάνω από το ΑΜΣ αμινοσιλανίου.

Μετά τη λιθογραφία θετικού τόνου ακολουθεί η διεργασία για την ακινητοποίηση της βιοτίνης. Η επιφάνεια εμβαπτίζεται στο διάλυμα της βιοτίνης, η οποία προσδένεται στα αποκεκαλυμμένα σημεία του ΑΜΣ αμινοσιλανίου. Αναλυτικά τα στάδια της διεργασίας για την επιλεκτική ακινητοποίηση της βιοτίνης παρουσιάζονται στο Σχήμα 92.

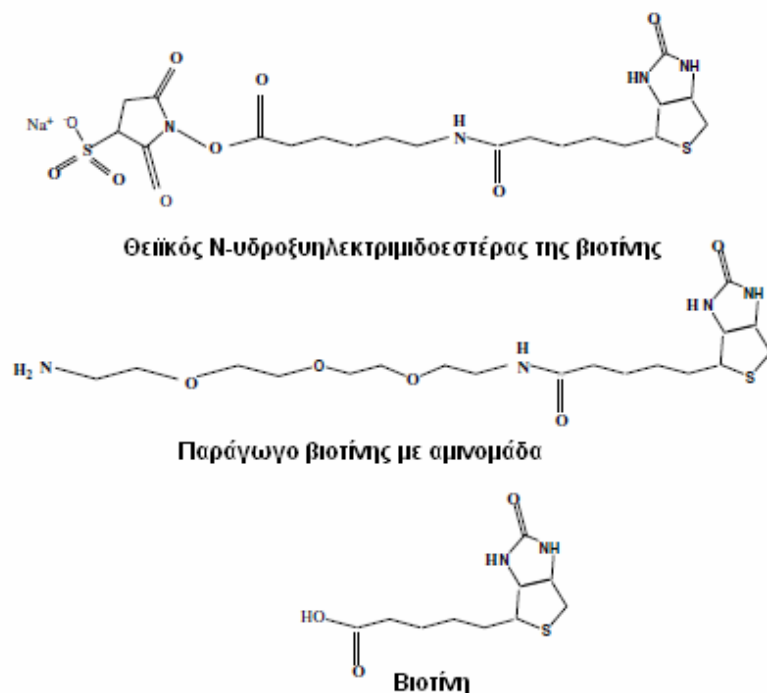


Σχήμα 92. Στάδια για την ακινητοποίηση της βιοτίνης μέσω της τεχνικής της αποκόλλησης.

### 1.1.2. Τροποποίηση της επιφάνειας πυριτίου με Αυτοοργανωμένο Μονομοριακό Στρώμα αμινοσιλανίου

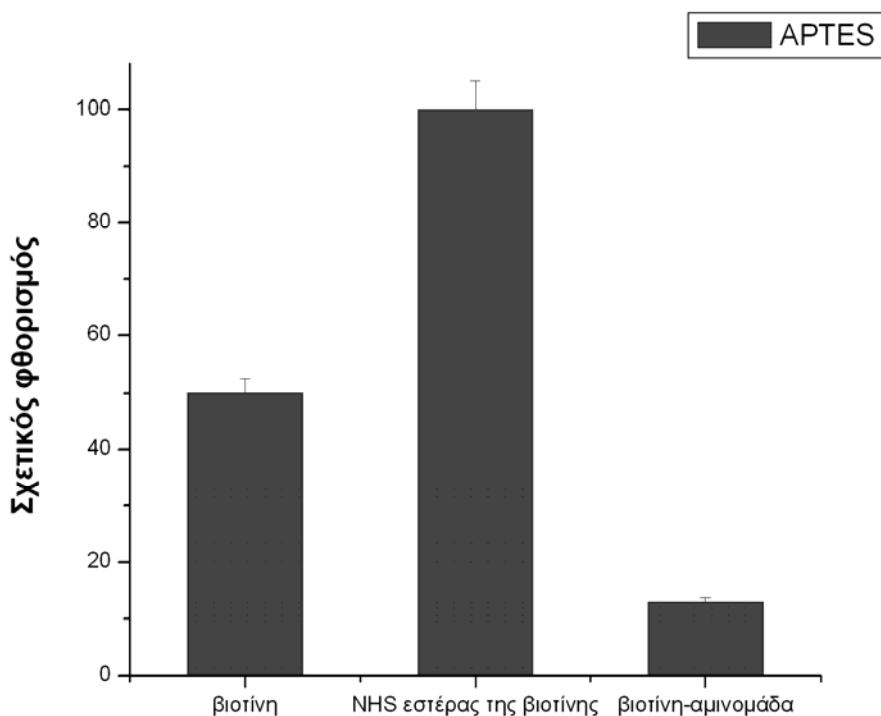
Αρχικά, το δισκίο πυριτίου τροποποιήθηκε με Αυτοοργανωμένο Μονομοριακό Στρώμα (ΑΜΣ) αμινοσιλανίου APTES για να είναι δυνατή η χημική πρόσδεση της βιοτίνης και παραγώγων της βιοτίνης. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν δύο παράγωγα βιοτίνης, ένα παράγωγο βιοτίνης με αμινομάδα και ένα παράγωγο βιοτίνης με θειϊκό N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα (N-Hydroxysulfosuccinimide ester, Sulfo-NHS ester) και η σκέτη βιοτίνη. Στα παράγωγα βιοτίνης το μήκος της αλυσίδας που φέρει τη δραστική ομάδα (αλυσίδα μεταξύ της βιοτίνης και της δραστικής ομάδας) είναι παρόμοιο,  $\sim 23 \text{ \AA}$ , (spacer arm length) για να είναι τα αποτελέσματα συγκρίσιμα και για να είναι συγκρίσιμη η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης μετά την ακινητοποίησή τους στην επιφάνεια. Οι συντακτικοί τύποι των παραγώγων βιοτίνης παρουσιάζονται στο Σχήμα 93.





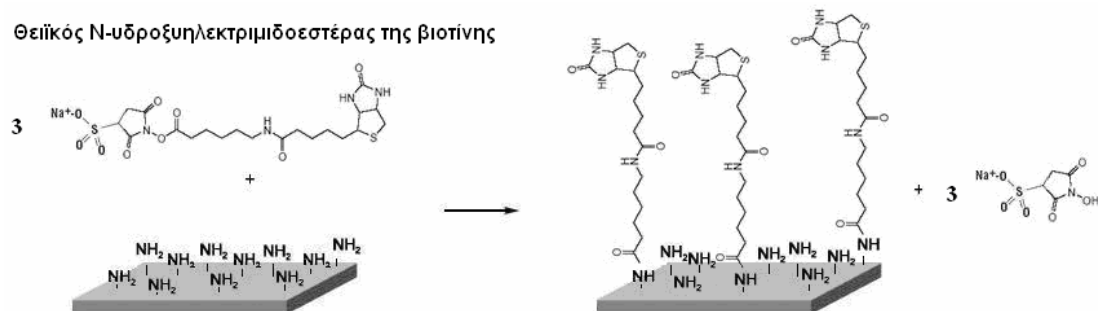
**Σχήμα 93.** Συντακτικοί τύποι του θεϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης, του παραγώγου βιοτίνης με αμινομάδα και της βιοτίνης.

Αρχικά, μελετήθηκε αν στο ΑΜΣ αμινοσιλανίου μπορούν να προσδεθούν τα παράγωγα της βιοτίνης και η βιοτίνη (Σχήμα 94).



**Σχήμα 94.** Προσδιορισμός της πρόσδεσης της βιοτίνης και των παραγώγων της, παράγωγο της βιοτίνης με αμινομάδα και παράγωγο της βιοτίνης με θεϊκό N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα, στην επιφάνεια του ΑΜΣ αμινοσιλανίου.

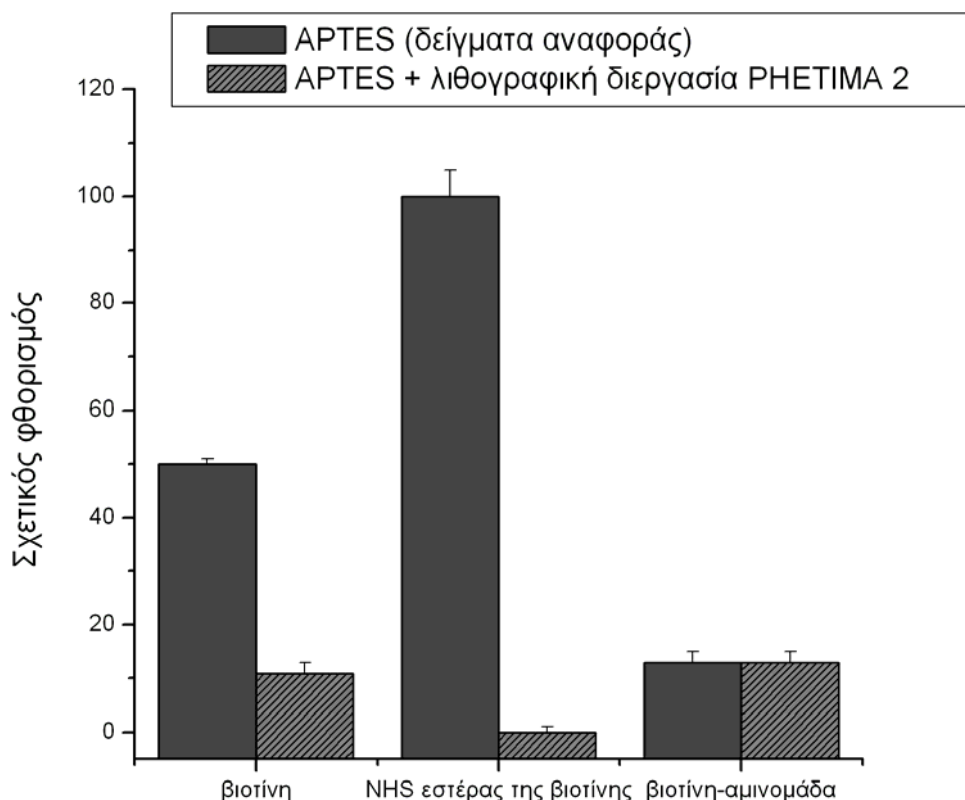
Παρατηρήθηκε ότι ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης προσδέθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στην επιφάνεια του αμινοσιλανίου. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ του αμινοσιλανίου και του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης παρουσιάζεται στο Σχήμα 95.



**Σχήμα 95.** Αντίδραση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης σε επιφάνεια πυριτίου που έχει τροποποιηθεί με ΑΜΣ αμινοσιλανίου [203].

### 1.1.3. Μελέτη της λιθογραφίας του φωτοευαίσθητου υμενίου πάνω στο ΑΜΣ αμινοσιλανίου

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η φωτολιθογραφία του φωτοευαίσθητου υλικού προκειμένου να καθοδηγηθεί η πρόσδεση της βιοτίνης σε συγκεκριμένες περιοχές. Η διεργασία για τη λιθογραφία θετικού τόνου του φωτοευαίσθητου υμενίου (πολυακρυλικό τετραπολυμερές, PHETIMA 2) ήταν η εξής: επίστρωση στις 4000 rpm για 1 min, ΡΑΒ στους 120 °C για 5 min, έκθεση, ΡΕΒ στους 50 °C για 3 min και εμφάνιση σε αραιωμένο υδατικό διάλυμα ΤΜΑΗ 1:100 για 2.5 min.



**Σχήμα 96.** Σύγκριση της ικανότητας πρόσδεσης του αμινοσιλανίου πριν και μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου ΡΗΕΤΙΜΑ 2.

Από το Σχήμα 96, στο οποίο συγκρίνεται η ικανότητα πρόσδεσης του στρώματος του αμινοσιλανίου πριν και μετά την εναπόθεση του φωτοπολυμερικού υμενίου PHETIMA 2, παρατηρείται ότι η ικανότητα πρόσδεσής του ΑΜΣ αμινοσιλανίου επηρεάζεται από τη διεργασία της λιθογραφίας.

Στο δείγμα του αμινοσιλανίου που είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του PHETIMA 2 κατά την εμφάνιση στο παράγωγο βιοτίνης με αμινομάδα χρησιμοποιήθηκε το χλωριούχο άλας του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-καρβοδιιμίδιου (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide Hydrochloride, EDC) γιατί υποθέτουμε ότι η επιφάνεια του ΑΜΣ αμινοσιλανίου περιέχει πιθανόν καρβοξυλομάδες μετά τη λιθογραφία του φωτοπολυμερικού υμενίου PHETIMA 2.

Από το προηγούμενο πείραμα συμπεραίνεται ότι το ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ απενεργοποιείται κατά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 2. Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ότι συμβαίνει κάποια αντίδραση ανάμεσα στις καρβοξυλομάδες του φωτοπολυμερικού υλικού και στις αμινομάδες του ΑΜΣ του αμινοσιλανίου. Τα δύο στρώματα είναι πιθανό να αντιδρούν στο στάδιο που η θερμοκρασία είναι πολύ αυξημένη. Το στάδιο αυτό είναι το στάδιο της θέρμανσης μετά την επίστρωση (ΡΑΒ). Για να αποδειχτεί η παραπάνω υπόθεση μελετήθηκαν οι μεταβολές στις γωνίες επαφής για διάφορες θερμοκρασίες ΡΑΒ.

Αρχικά η επιφάνεια του πυριτίου τροποποιήθηκε με ΑΜΣ αμινοσιλανίου. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν 3 δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε όλη η διεργασία της λιθογραφίας, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η γωνία επαφής του ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ μετά τη λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 2 σε διάφορες συνθήκες. Οι γωνίες επαφής των δειγμάτων αυτών συγκρίθηκαν με τις γωνίες επαφής του δείγματος αναφοράς (ΑΡΤΕΣ 2% κ.ό. διαλυμένο σε απιονισμένο νερό), δηλαδή της αρχικής επιφάνειας που είχε τροποποιηθεί με το ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ και της γωνίας επαφής της αρχικής επίστρωσης του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 2 (Πίνακας 4). Τα στάδια της λιθογραφικής διεργασίας του φωτοευαίσθητου υμενίου ήταν τα εξής: επίστρωση στις 4000 rpm για 1 min, θέρμανση ΡΑΒ στους 120 °C ή στους 50 °C ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min, έκθεση στα 360 nm, θέρμανση ΡΕΒ στους 50 °C για 3 min και εμφάνιση σε αραιωμένο υδατικό διάλυμα ΤΜΑΗ 1:100 για 2.5 min

**Πίνακας 4.** Γωνίες επαφής του αρχικού ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ (ΑΡΤΕΣ 2% κ.ό.), της αρχικής επίστρωσης του φωτοευαίσθητου υμενίου (πολυμερές PHETIMA 2) και των ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ μετά από τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 2 για διαφορετικές θερμοκρασίες ΡΑΒ.

	<b>ΑΡΤΕΣ 2% κ.ό.</b>	<b>Πολυμερές PHETIMA 2</b>	<b>ΡΑΒ 120°C</b>	<b>ΡΑΒ 50°C</b>	<b>ΡΑΒ στη θερμοκρασία περιβάλλοντος</b>
Γωνία επαφής	59°	80°	70°	64.5°	64°

Από τις μετρήσεις των γωνιών επαφής παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του ΡΑΒ τόσο οι γωνίες του υποκείμενου ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ τείνουν στη γωνία επαφής του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 2. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ κατά τη λιθογραφική διεργασία «μολύνεται» από το πολυμερικό υμένιο. Ενδεχομένως, κάποιες αλυσίδες πολυμερούς να αντιδρούν με τις αμινομάδες του ΑΡΤΕΣ και να μην είναι δυνατό να απομακρυνθούν κατά το στάδιο της εμφάνισης.

Για να επιβεβαιωθεί η επίδραση της θερμοκρασίας του PAB, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα χρησιμοποιώντας ένα ακρυλικό τετραπολυμερές το οποίο δεν είναι απαραίτητο να θερμανθεί μετά την έκθεση για να λάβει χώρα η αποπροστασία του τριτοταγούς βουτυλεστέρα. Το φωτοευαίσθητο υμένιο είναι το πολυακρυλικό τετραπολυμερές PHETIMA 1. Οι γωνίες επαφής που προέκυψαν δίνονται στον Πίνακα 5. Τα στάδια της λιθογραφικής διεργασίας για την εναπόθεση και την εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 1 ήταν τα εξής: επίστρωση στις 4000 rpm για 1 min, θέρμανση PAB στους 120 °C ή 50 °C ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 min, έκθεση στα 360 nm και εμφάνιση σε αραιωμένο υδατικό διάλυμα TMAH 1:100 για 2.5 min.

**Πίνακας 5.** Γωνίες επαφής του αρχικού ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ (ΑΡΤΕΣ 2% κ.ό.), της αρχικής επίστρωσης του φωτοευαίσθητου υμενίου (πολυμερές PHETIMA 1) και των ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ μετά από τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 1 για διαφορετικές θερμοκρασίες PAB.

	<b>ΑΡΤΕΣ 2% κ.ό.</b>	<b>Πολυμερές PHETIMA 1</b>	<b>PAB 120°C</b>	<b>PAB 50°C</b>	<b>PAB στη θερμοκρασία περιβάλλοντος</b>
Γωνία επαφής	57°	78°	75.5°	66.5°	64°

Παρατηρείται και στο συγκεκριμένο πείραμα ότι, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του PAB, τόσο οι γωνίες επαφής του υποκείμενου ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ μετά τη λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υλικού PHETIMA 1 τείνουν στη γωνία επαφής του πολυμερούς PHETIMA 1 και είναι διαφορετικές από την αρχική γωνία επαφής του ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι είναι αδύνατη η πλήρης απομάκρυνση του φωτοευαίσθητου υμενίου PHETIMA 1, με αποτέλεσμα να παραμένουν υπολείμματα τα οποία επηρεάζουν τις ιδιότητες του ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ.

Συμπερασματικά, από τα δύο πειράματα επιβεβαιώθηκε ότι αλυσίδες του φωτοευαίσθητου υμενίου προσδένονται κατά τη λιθογραφική διεργασία στο ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ επηρεάζοντας τις ιδιότητές του, τις γωνίες επαφής και την ικανότητα χημικής πρόσδεσης των βιομορίων. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε ότι η αντίδραση μεταξύ του ΑΜΣ του ΑΡΤΕΣ και του φωτοευαίσθητου υμενίου, PHETIMA 2 για το πρώτο πείραμα και PHETIMA 1 για το δεύτερο πείραμα, πραγματοποιείται στο στάδιο της θέρμανσης μετά την επίστρωση (PAB).

Από τα προηγούμενα πειράματα συμπεραίνεται ότι είναι αδύνατη η επίτευξη της ακινητοποίησης της βιοτίνης μέσω της προτεινόμενης διεργασίας αποκόλλησης (Σχήματα 91 και 92). Το μειονέκτημα της διεργασίας αποκόλλησης ήταν η «μόλυνση» του υποστρώματος, στο οποίο θα προσδεθεί η βιοτίνη, από τη λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου. Στη συνέχεια για την επίτευξη του ίδιου στόχου επιλέχθηκαν λιθογραφικά υμένια πάνω στα οποία αναμένεται αποτελεσματική χημική πρόσδεση των παραγώγων της βιοτίνης.

## **1.2. Διεργασία για τη σχηματοποίηση της βιοτίνης σε φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο**

### **1.2.1. Επιλογή συστήματος**

Στη βιβλιογραφία εφαρμόζονται αρκετά ΑΜΣ, τα οποία έχουν ως τερματική ομάδα τον εποξειδικό δακτύλιο για την πρόσδεση πρωτεϊνών. Αυτά τα ΑΜΣ είναι

σταθερά σε ουδέτερα pH και σε υγρές συνθήκες. Επιπρόσθετα, οι επιφάνειες αυτές μπορούν να διατηρηθούν και να αποθηκευτούν για μεγάλες χρονικές περιόδους [216]. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των ΑΜΣ είναι ότι δεν απαιτείται η τροποποίηση των πρωτεϊνών για την ακινητοποίησή τους, καθώς ο εποξειδικός δακτύλιος μπορεί να αντιδράσει με πολλές ομάδες που υπάρχουν στα αμινοξέα των πρωτεϊνών όπως αμινομάδες και καρβοξυλομάδες [217].

Αντιθέτως, τα ΑΜΣ που έχουν ως τερματική ομάδα την αμίνη, επειδή είναι θετικά φορτισμένα, μπορούν να αντιδράσουν ηλεκτροστατικά με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα των πρωτεϊνών και η προσρόφηση να μην είναι μόνο χημική, αλλά να γίνεται και φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών. Τα ΑΜΣ που έχουν εποξειδικές τερματικές ομάδες παρουσιάζουν χαμηλό θόρυβο καθώς οι μη ειδικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι δυνατές [218]. Γι' αυτούς τους λόγους επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τη χημική πρόσδεση της βιοτίνης ένα πολυμερικό υλικό που περιέχει εποξειδικές ομάδες, το οποίο μπορεί να σχηματιστεί μέσω φωτολιθογραφίας και είναι πιθανόν να προσδεθούν σε αυτό μέσω ομοιοπολικών δεσμών τα παράγωγα της βιοτίνης.

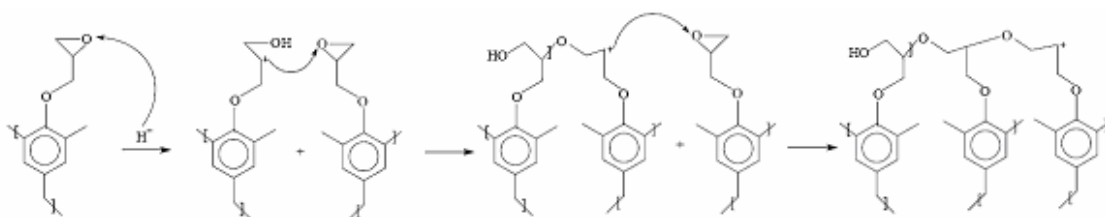
Μία γνωστή εμπορικά διαθέσιμη εποξειδική ρητίνη είναι ο γλυκιδιλικός αιθέρας της διφαινόλης Α (glycidyl ether of bisphenol A), γνωστή με την εμπορική ονομασία SU-8 (Σχήμα 40), η οποία αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Α.2.2.3.1.2.2. Η SU-8 έχει χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση βιολογικού υλικού. Για την ακινητοποίηση πρωτεΐνης μία μέθοδος που προτείνεται από τον Joshi [145] περιλαμβάνει τα εξής στάδια: αρχικά λαμβάνει χώρα η υδροξυλίωση της SU-8 σε οξειδωτικό διάλυμα  $K_2Cr_2O_7$  και  $H_2SO_4$ , στη συνέχεια οι  $-OH$  αντιδρούν με αμινοσιλάνιο, έπειτα με τις αμινομάδες της επιφάνειας αντιδρά η γλουταραλδεΐδη (παράγοντας που έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει σταυροδεσμούς (cross-linking agent)) και τέλος ακινητοποιείται μέσω χημικής πρόσδεσης το ανθρώπινο αντίσωμα, συγκεκριμένα ακινητοποιήθηκε η ανοσοσφαιρίνη G. Η ανίχνευση του αντισώματος έγινε με το συμπληρωματικό αντιγόνο, το οποίο ήταν επισημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης (FITC). Επίσης στην SU-8 έχουν ακινητοποιηθεί ολιγονουκλεοτιδία σε ένα στάδιο, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η ακινητοποίηση στηρίζεται σε δεσμούς μεταξύ του DNA και των εποξειδικών δακτυλίων, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ακριβώς ο δεσμός που σχηματίζεται [219].

Ένα μειονέκτημα της SU-8 είναι ο αυτο-φθορισμός της, που έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη θορύβου (σήματος που δεν αντιστοιχεί σε ακινητοποίηση βιολογικού υλικού) σε εφαρμογές όπου το βιολογικό υλικό ανιχνεύεται μέσω φθορισμού. Προκειμένου να είναι χαμηλό το σήμα αυτο-φθορισμού, χρησιμοποιούνται υμένια μικρού πάχους [219]. Υπάρχουν μελέτες για την παρασκευή υμενίων SU-8 μικρού πάχους [146]. Ένα ακόμα μειονέκτημα των εποξειδικών ρητινών είναι ο υδρόφοβος χαρακτήρας τους, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της φυσικής προσρόφησης των πρωτεϊνών. Ο Ταο έχει προτείνει τη χημική πρόσδεση ενός σιλανίου πολυ(αιθυλενογλυκόλης) προκειμένου να μειώσει τη φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών και των κυττάρων στην SU-8 [220]. Όμως η υδροφοβικότητα της SU-8 αποτελεί πλεονέκτημα έναντι άλλων υλικών τροποποίησης, για παράδειγμα υλικών που βασίζονται στις αλδεϋδομάδες, στις περιπτώσεις που το βιολογικό υλικό εναποτίθεται μέσω επαφής στις επιφάνειες (spot) καθώς η σταγόνα του βιομορίου δεν εξαπλώνεται στην επιφάνεια δημιουργώντας πιο ομοιογενή, κυκλικά και μικρότερης διαμέτρου σημεία (spot) [219]. Ο υδρόφοβος χαρακτήρας οφείλεται στους αρωματικούς δακτυλίους που έχουν οι εποξειδικές ρητίνες.

Στα πειράματα της παρούσας ενότητας των αποτελεσμάτων δεν χρήζει ιδιαίτερης σημασίας η υδροφοβικότητα των εποξειδικών ρητινών, γιατί τα βιομόρια που ακινητοποιούνται είναι μικρά βιομόρια, τα οποία δεν είναι δυνατόν να ακινητοποιηθούν μέσω φυσικής προσρόφησης στις επιφάνειες και επιπλέον χρησιμοποιούνται διαφορετικά παράγωγα βιοτίνης για να επιβεβαιωθεί ότι η ακινητοποίηση οφείλεται στην τροποποίηση της βιοτίνης.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή δεν χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη εποξειδική ρητίνη, δηλαδή η SU-8, προκειμένου να είναι περισσότερο ελεγχόμενη η σύσταση του υμενίου. Η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη (EPR) που χρησιμοποιήθηκε περιείχε εποξειδική ρητίνη μέσου μοριακού βάρους (μεσαίο κλάσμα που παραλαμβάνεται από την κλασμάτωση του πολυμερούς EPIKOTE) και εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS) σε ποσοστά που θα αναφερθούν στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

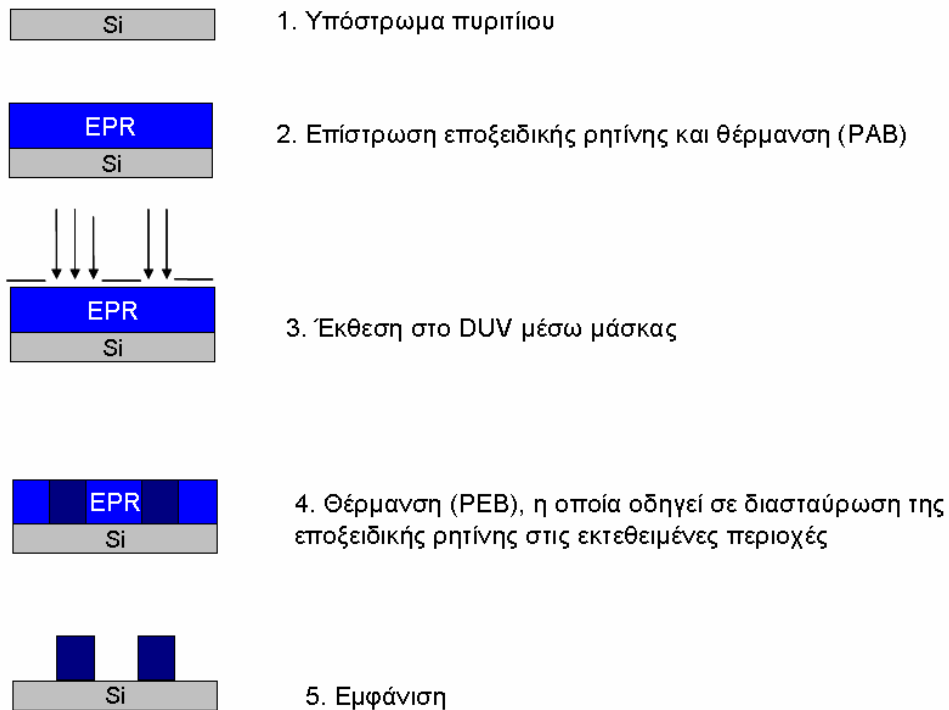
Η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη (Epoxy Resist, EPR) μπορεί να σχηματιστεί μέσω λιθογραφίας με τη χρήση κατάλληλου φωτοευαίσθητοποιητή. Στο Κεφάλαιο A.2.2.3.1.2.2 αναφέρθηκε ότι η εκκίνηση του κατιοντικού πολυμερισμού της SU-8 καταλύεται από ένα ισχυρό οξύ. Στην παρούσα Διατριβή ο φωτο-παραγωγός οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την εκκίνηση του κατιοντικού πολυμερισμού της EPR ήταν το εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS). Το TPS μετά από έκθεση σε UV παράγει ένα ισχυρό οξύ και εκκινεί τον κατιοντικό πολυμερισμό της EPR (Σχήμα 97), με αποτέλεσμα τη δικτύωση της στις εκτεθειμένες περιοχές και τη δημιουργία δομών (λιθογραφία αρνητικού τόνου).



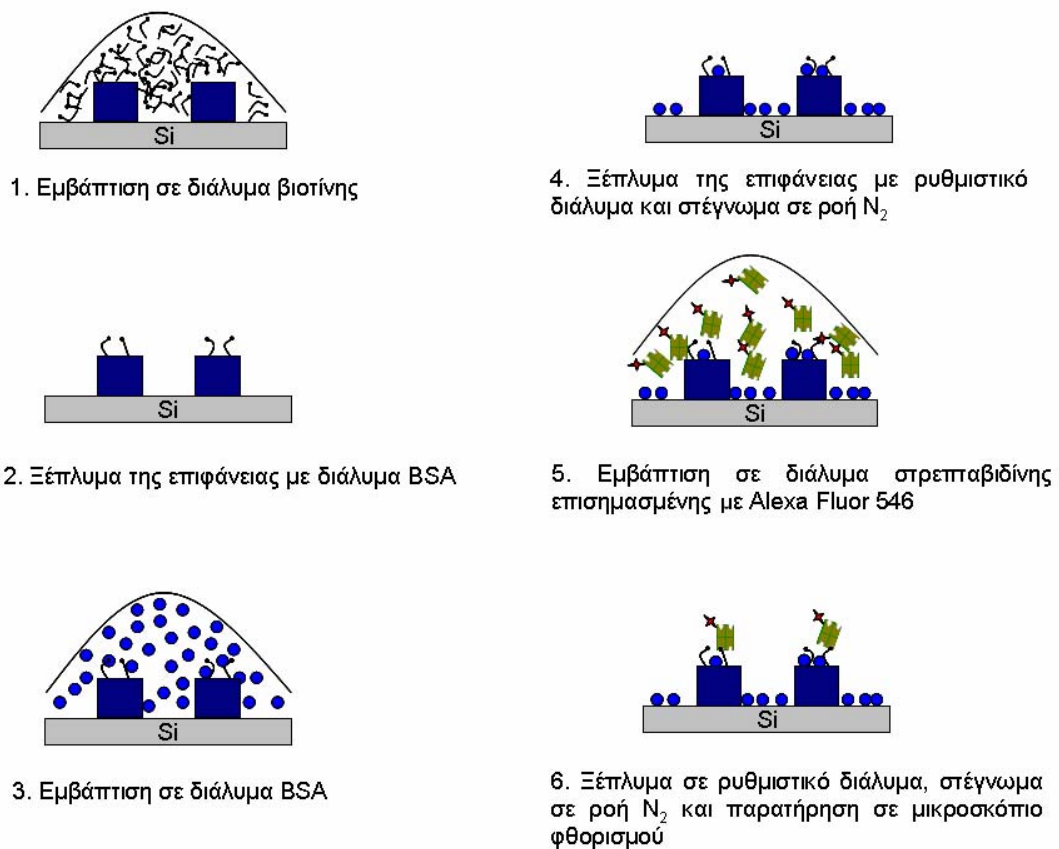
**Σχήμα 97.** Διασταύρωση της εποξειδικής ρητίνης EPR με χρήση κατάλληλου φωτο-παραγωγού οξέος [148].

Συνολικά η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζεται στο Σχήμα 98. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η τροποποίηση της επιφάνειας του πυριτίου και η σχηματοποίηση της πραγματοποιούνται στο ίδιο στάδιο από το ίδιο υλικό. Το υλικό αυτό είναι η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη (EPR), η οποία σχηματοποιείται μέσω φωτολιθογραφίας. Τελικά η επιφάνεια εμβαπτίζεται στο διάλυμα του παράγωγου της βιοτίνης, το οποίο προσδένεται στο σχηματοποιημένο φωτοευαίσθητο υμένιο εποξειδικής ρητίνης (EPR). Η διεργασία για τη σχηματοποίηση των παραγώγων της βιοτίνης σε συγκεκριμένα σημεία του υποστρώματος παρουσιάζεται στο Σχήμα 99.

Το πλεονέκτημα της χρήσης της EPR στη συγκεκριμένη εφαρμογή είναι ότι η τροποποίηση της επιφάνειας και η λιθογραφία πραγματοποιούνται από το ίδιο υλικό σε ένα στάδιο, με αποτέλεσμα η διεργασία να είναι λιγότερο χρονοβόρα και επίσης η επιφάνεια, στην οποία τελικά προσδένονται τα βιομόρια, να μην αλλοιώνεται από κάποιο άλλο υλικό που εφαρμόζεται πάνω από την ενεργή επιφάνεια, όπως συνέβαινε με το ΑΜΣ του APTES (Σχήμα 91).



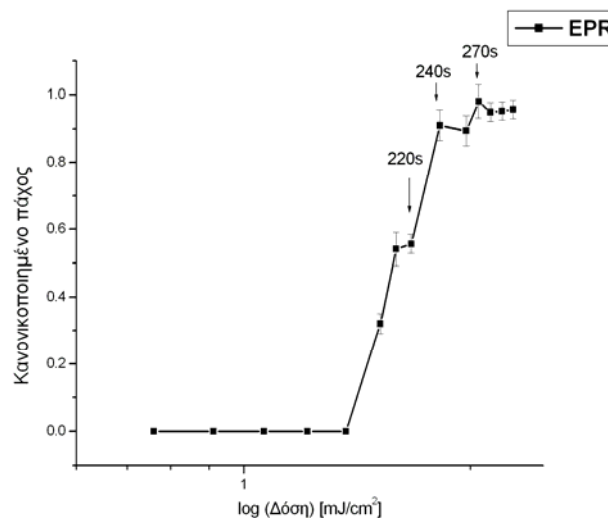
**Σχήμα 98.** Διεργασία για τη λιθογραφία αρνητικού τόνου της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης (EPR).



**Σχήμα 99.** Στάδια για την ακινητοποίηση της βιοτίνης στις λιθογραφημένες επιφάνειες της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης (EPR).

### 1.2.2. Μελέτη της λιθογραφίας της εποξειδικής ρητίνης EPR και βελτιστοποίησή της

Αρχικά ήταν απαραίτητο να προσδιοριστεί η κατάλληλη δόση έκθεσης για τη διασταύρωση της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης (Epoxy resist, EPR), έτσι ώστε να παραμένουν εποξειδικοί δακτύλιοι στη ρητίνη και να μην καταναλωθούν στον κατιοντικό πολυμερισμό με σκοπό να μπορούν να προσδεθούν ομοιοπολικά τα βιομόρια. Γι' αυτό προσδιορίστηκε η καμπύλη αντίθεσης της EPR, που περιέχει 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη διαλυμένη σε PGMEA και 1% κ.β. επί των στερεών φωτο-παραγωγό οξέος TPS (Σχήμα 100). Οι πειραματικές συνθήκες για τη λήψη της καμπύλης αντίθεσης ήταν επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min και θέρμανση PAB στους 90 °C για 3 min. Οι εκθέσεις έγιναν με φίλτρο στα 249 nm. Οι συνθήκες μετά την έκθεση ήταν θέρμανση PEB στους 100°C για 3 min και εμφάνιση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (Ethyl Lactate, EL) για 1 min. Ξέπλυμα με ισοπροπανόλη.



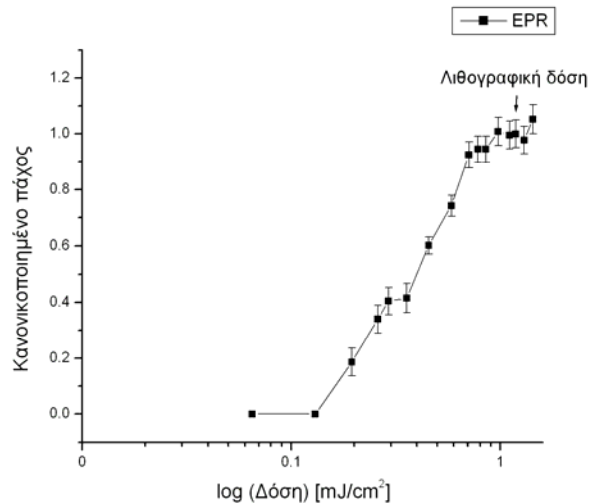
**Σχήμα 100.** Καμπύλη αντίθεσης της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης EPR με περιεκτικότητα σε φωτο-παραγωγό οξέος TPS 1% κ.β. επί των στερεών.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διακριτική ικανότητα της EPR προσδιορίστηκε το ποσοστό του φωτο-παραγωγού οξέος TPS που είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί η βέλτιστη διακριτική ικανότητα. Η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR δίνει τα βέλτιστα λιθογραφικά αποτελέσματα όταν περιέχει 5% κ.β. επί των στερεών φωτο-παραγωγό οξέος TPS.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η καμπύλη αντίθεσης του υλικού για αυτή τη σύσταση (19% κ.β. εποξειδική ρητίνη και 5% κ.β. επί των στερεών TPS) με σκοπό να καθοριστεί η απαραίτητη δόση έκθεσης για την επίτευξη της λιθογραφίας αρνητικού τόνου (Σχήμα 101). Οι πειραματικές συνθήκες για τη λήψη της καμπύλης αντίθεσης ήταν επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min και θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min. Οι εκθέσεις έγιναν με φίλτρο στα 249 nm. Οι συνθήκες μετά την έκθεση ήταν θέρμανση PEB στους 90 °C για 3 min και εμφάνιση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (EL) για 1 min. Ξέπλυμα με ισοπροπανόλη.

Από την καμπύλη αντίθεσης του Σχήματος 101 παρατηρείται ότι η EPR παρουσία 5% κ.β. επί των στερεών TPS δεν παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίθεση συγκρινόμενη με την καμπύλη αντίθεσης της EPR, η οποία περιέχει 1% κ.β. επί των στερεών φωτο-παραγωγό οξέος TPS. Όμως με αυτήν την περιεκτικότητα (5% κ.β. επί των στερεών TPS) επιτυγχάνεται η μέγιστη διακριτική ικανότητα.

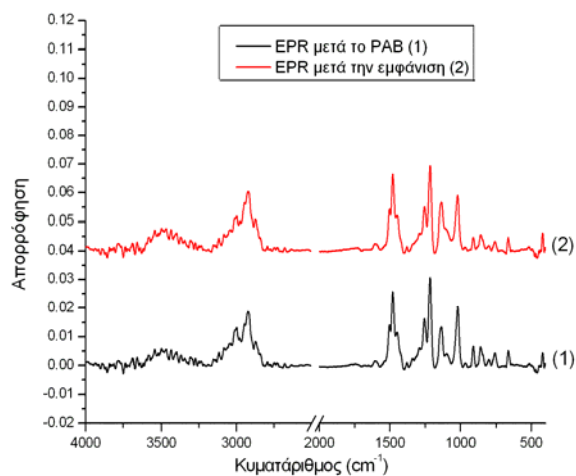




**Σχήμα 101.** Καμπύλη αντίθεσης της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης EPR με περιεκτικότητα σε φωτο-παραγωγό οξέος TPS 5% κ.β. επί των στερεών.

Τέλος, μελετήθηκε η κατανάλωση εποξειδικών δακτυλίων στη λιθογραφική δόση μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (Σχήμα 102). Η κατανάλωση εποξειδικών δακτυλίων είναι απαραίτητη για τη δημιουργία πλέγματος στην EPR, έτσι ώστε το υμένιο να είναι αδιάλυτο κατά το στάδιο της εμφάνισης. Η κατανάλωση των εποξειδικών δακτυλίων είναι επιθυμητό να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, με σκοπό να είναι εφικτή η ακινητοποίηση των παραγώγων της βιοτίνης.

Οι πειραματικές συνθήκες για την παρασκευή των δειγμάτων (Σχήμα 102) ήταν: 1) Επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min και θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min διαλύματος EPR, που περιέχει 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη διαλυμένη σε PGMEA και 5% κ.β. επί των στερεών φωτο-παραγωγό οξέος TPS. 2) Επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min και θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min διαλύματος EPR, που περιέχει 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη διαλυμένη σε PGMEA και 5% κ.β. επί των στερεών φωτο-παραγωγό οξέος TPS. Έκθεση 140 s με φίλτρο στα 249 nm. Οι συνθήκες μετά την έκθεση ήταν θέρμανση PEB στους 90 °C για 3 min και εμφάνιση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (EL) για 1 min. Ξέπλυμα με ισοπροπανόλη.



**Σχήμα 102.** Φάσματα υπερύθρου: 1) για το αρχικό υμένιο EPR μετά το PAB και 2) για το διασταυρωμένο υμένιο EPR μετά την εμφάνιση, στο οποίο η έκθεση πραγματοποιήθηκε στη λιθογραφική δόση.

Η καταστροφή των εποξειδικών δακτυλίων παρακολουθείται με φασματοσκοπία υπερύθρου μέσω της κορυφής στα  $3000\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης της ομάδας  $-\text{CH}_2-$  του εποξειδικού δακτυλίου. Από τα φάσματα υπερύθρου του Σχήματος 102 παρατηρείται ότι στο υμένιο μετά την πραγματοποίηση της έκθεσης στη λιθογραφική δόση και της θέρμανσης PEB (φάσμα 2) η κατανάλωση εποξειδικών δακτυλίων αντιστοιχεί σε ποσοστό μικρότερο του 15%. Επομένως, υπάρχουν πολλές εναπομείνουσες εποξειδικές ομάδες που μπορούν να αντιδράσουν με τα τροποποιημένα παράγωγα της βιοτίνης.

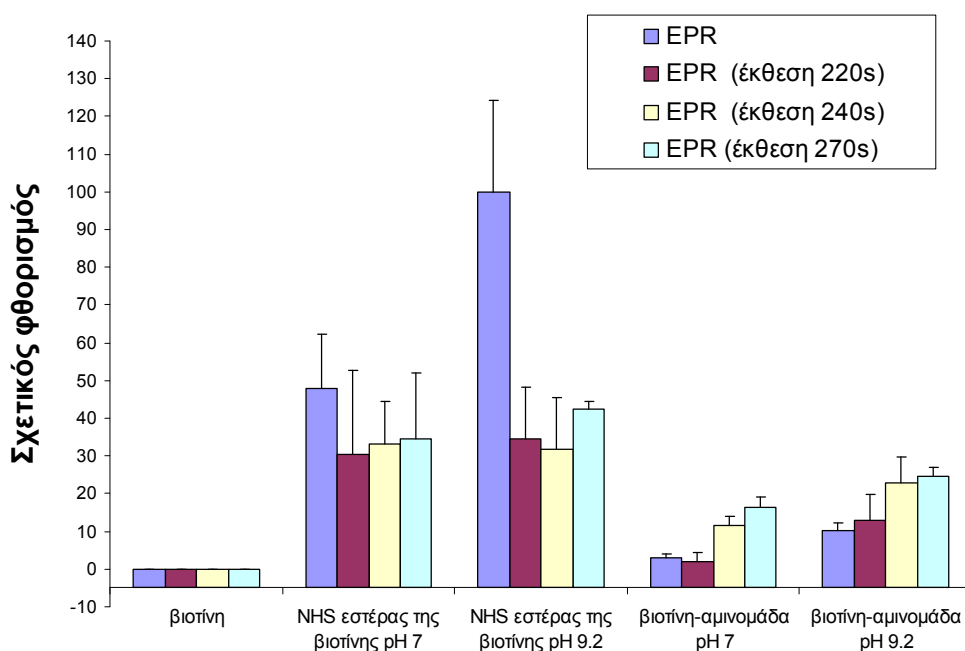
### 1.2.3. Πρόσδεση της βιοτίνης σε φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης βιομορίων στη διασταυρωμένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR. (Πειραματικές συνθήκες: Εποξειδική ρητίνη 19% κ.β. διαλυμένη σε PGMEA στην οποία προστέθηκε φωτο-παραγωγός οξέος TPS 1% κ.β. επί των στερεών. Για την παρασκευή των δειγμάτων έγινε επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min και η θέρμανση PAB στους  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 3 min. Οι εκθέσεις έγιναν με φίλτρο στα 249 nm. Μετά την έκθεση πραγματοποιήθηκε θέρμανση PEB στους  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 3 min). Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν EPR σε διάφορους χρόνους έκθεσης, 220 sec, 240 sec, 270 sec και η ικανότητα πρόσδεσης σε αυτά συγκρίθηκε με την ικανότητα πρόσδεσης του μη εκτεθειμένου υμενίου EPR (στο Σχήμα 103 αναφέρεται ως EPR και παρασκευάστηκε με επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min και θέρμανση PAB στους  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 3 min.).

Τα βιομόρια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (NHS εστέρας της βιοτίνης), παράγωγο βιοτίνης με αμινομάδα και βιοτίνη. Τα παράγωγα βιοτίνης διαλύθηκαν είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.0 είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων 0.05M, pH 9.2 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mg/mL. Η ικανότητα πρόσδεσης προσδιορίστηκε με φθορισμό μέσω της αντίδρασης των βιομορίων με στρεπταβιδίνη, η οποία ήταν επισημασμένη με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546. Επιλέχθηκαν ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (NHS εστέρας της βιοτίνης) και το παράγωγο βιοτίνης με αμινομάδα γιατί έχουν παρόμοιο μήκος,  $\sim 23\text{ \AA}$ , (spacer arm length) μεταξύ της δραστικής ομάδας και της βιοτίνης για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα εφόσον η πρόσβαση της στρεπταβιδίνης στην ακινητοποιημένη βιοτίνη θα είναι παρόμοια.

Από το Σχήμα 103 συμπεραίνεται ότι ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (NHS εστέρας της βιοτίνης) είναι το βιομόριο που προσδένεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR. Επίσης, συμπεραίνεται ότι η αντίδραση διασταύρωσης επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης της EPR, καθώς τα δείγματα που έχουν εκτεθεί παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (EPR). Συγκεκριμένα, στα εκτεθειμένα υμένια μειώνεται η ικανότητα πρόσδεσης του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης, ενώ αυξάνεται η ικανότητα πρόσδεσης του παραγώγου της βιοτίνης με αμινομάδα. Επίσης, ενδιαφέρουσα είναι η σύγκριση του δείγματος EPR, το οποίο παρουσιάζει διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης στα βιομόρια τα οποία ήταν διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων pH 9.2, σε σχέση με τα ίδια βιομόρια τα οποία ήταν διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH 7. Η διαφοροποίηση αυτή είναι πιθανό να σχετίζεται με τις ιδιότητες διαβροχής των ρυθμιστικών διαλυμάτων με την επιφάνεια. Από τα αποτελέσματα του Σχήματος 103 συμπεραίνεται ότι λαμβάνει χώρα χημική πρόσδεση, γιατί με τη μεταβολή της δραστικής ομάδας που φέρουν τα παράγωγα της βιοτίνης αλλάζει και η ικανότητα

πρόσδεσης της επιφάνειας και επίσης παρατηρείται ότι η βιοτίνη δεν προσδένεται στα δείγματα.

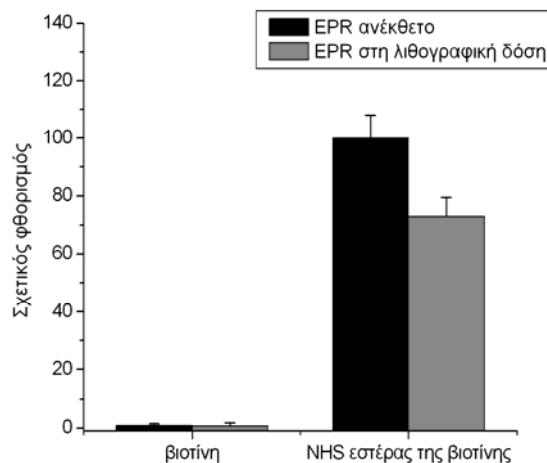


**Σχήμα 103.** Σύγκριση της ικανότητας πρόσδεσης της βιοτίνης και παραγώγων της βιοτίνης στη διασταυρωμένη εποξειδική ρητίνη EPR σε διάφορους χρόνους έκθεσης σε σχέση με τη μη διασταυρωμένη εποξειδική ρητίνη (EPR).

Στη συνέχεια επιλέχθηκε να ακινητοποιηθεί ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης επειδή είναι το παράγωγο της βιοτίνης που προσδένεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην εποξειδική ρητίνη και προσδιορίστηκε η ικανότητα πρόσδεσης της διασταυρωμένης εποξειδικής ρητίνης στις βέλτιστες λιθογραφικές συνθήκες (Σχήμα 104). (Πειραματικές συνθήκες: επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min διαλύματος EPR, που περιείχε 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη και 5% κ.β. επί των στερεών TPS. Θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min. Έκθεση στη λιθογραφική δόση με φίλτρο στα 249 nm. Οι συνθήκες μετά την έκθεση ήταν θέρμανση PEB στους 90 °C για 3 min. Ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (NHS εστέρας της βιοτίνης) διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.0 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mg/mL).

Από το Σχήμα 104 συμπεραίνεται ότι η πρόσδεση της βιοτίνης είναι μηδενική σε όλα τα δείγματα, ενώ ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (NHS εστέρας της βιοτίνης) ακινητοποιείται σε όλα τα δείγματα. Αυτό αποτελεί ένδειξη της χημικής πρόσδεσης της βιοτίνης και αποκλείει τη φυσική προσρόφησή της στα δείγματα. Επίσης από το Σχήμα 104 παρατηρείται ότι ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (NHS εστέρας της βιοτίνης) προσδένεται λιγότερο στο εκτεθειμένο υμένιο σε σχέση με το ανέκθετο. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς με τη διασταύρωση της EPR καταναλώνονται εποξειδικοί δακτύλιοι που δεν υπάρχουν πλέον για να αντιδράσουν με το παράγωγο της βιοτίνης.

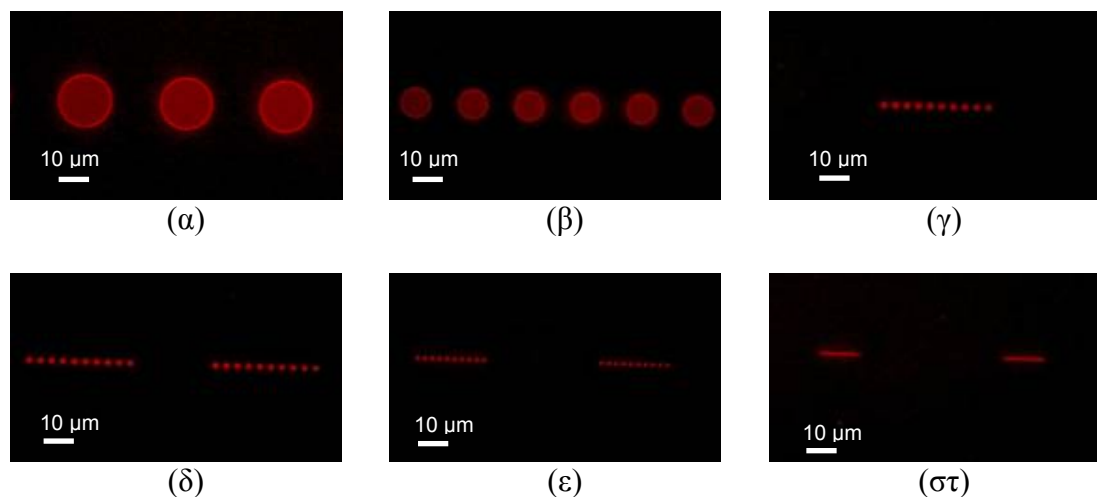
Η πρόσδεση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης εικάζεται ότι πραγματοποιείται μέσω αντίδρασης της εποξειδικής ρητίνης με τον ενεργοποιημένο εστέρα που υπάρχει στο παράγωγο της βιοτίνης. Η αντίδραση αυτή θα μελετηθεί στο παρακάτω Κεφάλαιο Γ.1.2.5.



**Σχήμα 104.** Σύγκριση της ικανότητας πρόσδεσης της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης EPR στη λιθογραφική δόση σε σχέση με το ανέκθετο αρχικό υμένιο (EPR ανέκθετο).

#### 1.2.4. Κατασκευή μικροδομών βιοτίνης και μικροδομών του ισοθειοκυανικού άλατος της φορεσκειΐνης

Μετά από τη μελέτη που παρουσιάστηκε στα Κεφάλαια Γ.1.2.2 και Γ.1.2.3 ήταν δυνατή η ακινητοποίηση της βιοτίνης σε μικροδομές διασταυρωμένης φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης. Συγκεκριμένα ακινητοποιήθηκε ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης σε δομές διασταυρωμένης φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης, οι οποίες είχαν κατασκευαστεί μέσω λιθογραφίας πάνω σε επιφάνεια πυριτίου (Σχήμα 105).

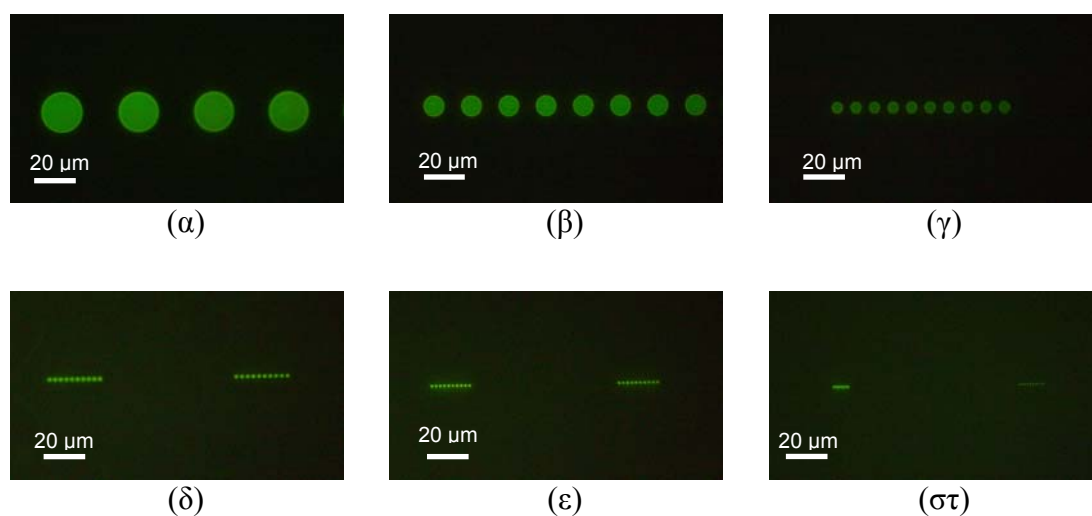


**Σχήμα 105.** Μικροδομές α) 20  $\mu\text{m}$  β) 10  $\mu\text{m}$  γ) 1.5  $\mu\text{m}$  δ) 1  $\mu\text{m}$  ε) 0.75  $\mu\text{m}$  στ) 0.5  $\mu\text{m}$  του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης μέσω σχηματοποιημένης εποξειδικής ρητίνης EPR. Ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης ανιχνεύτηκε με φθορισμό μέσω της αντίδρασης της ακινητοποιημένης βιοτίνης με στρεπταβιδίνη, η οποία ήταν επισημασμένη με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546. Φωτογραφίες από το μικροσκόπιο φθορισμού.

Για την κατασκευή των μικροδομών διασταυρωμένης φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης πραγματοποιήθηκε επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min του διαλύματος EPR που περιείχε 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη διαλυμένη σε PGMEA στο οποίο είχε προστεθεί φωτο-παραγωγός οξέος TPS 5% κ.β. επί των στερεών.

Ακολούθησε θέρμανση (PAB) στους 110 °C για 3 min. Η έκθεση έγινε μέσω μάσκας λιθογραφίας και με φίλτρο στα 249 nm. Ο χρόνος έκθεσης ήταν 140 sec. Οι συνθήκες μετά την έκθεση ήταν θέρμανση PEB στους 90 °C για 3 min και εμφάνιση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (EL) για 1 min. Ξέπλυμα με ισοπροπανόλη (Σχήμα 105).

Επίσης, σε μικροδομές εποξειδικής ρητίνης, οι οποίες είχαν κατασκευαστεί μέσω λιθογραφίας πάνω σε επιφάνεια πυριτίου ακινητοποιήθηκε το ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης σε τελική συγκέντρωση 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (fluorescein isothiocyanate, FITC) (Σχήμα 106). Για την κατασκευή των μικροδομών της διασταυρωμένης φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης πραγματοποιήθηκε επίστρωση στις 5000 rpm για 1 min διαλύματος EPR (19% κ.β. εποξειδικής ρητίνης και 5% κ.β. επί των στερεών TPS). Θέρμανση (PAB) στους 110 °C για 3 min. Έκθεση 140 sec μέσω μάσκας λιθογραφίας με φίλτρο στα 249 nm. Θέρμανση PEB στους 90 °C για 3 min. Εμφάνιση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα (EL) για 1 min. Ξέπλυμα με ισοπροπανόλη



**Σχήμα 106.** Μικροδομές α) 20  $\mu\text{m}$  β) 10  $\mu\text{m}$  γ) 5  $\mu\text{m}$  δ) 1  $\mu\text{m}$  ε) 0.75  $\mu\text{m}$  στ) 0.5  $\mu\text{m}$  του ισοθειοκυανικού άλατος της φθορεσκεΐνης μέσω της σχηματοποιημένης εποξειδικής ρητίνης EPR. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού.

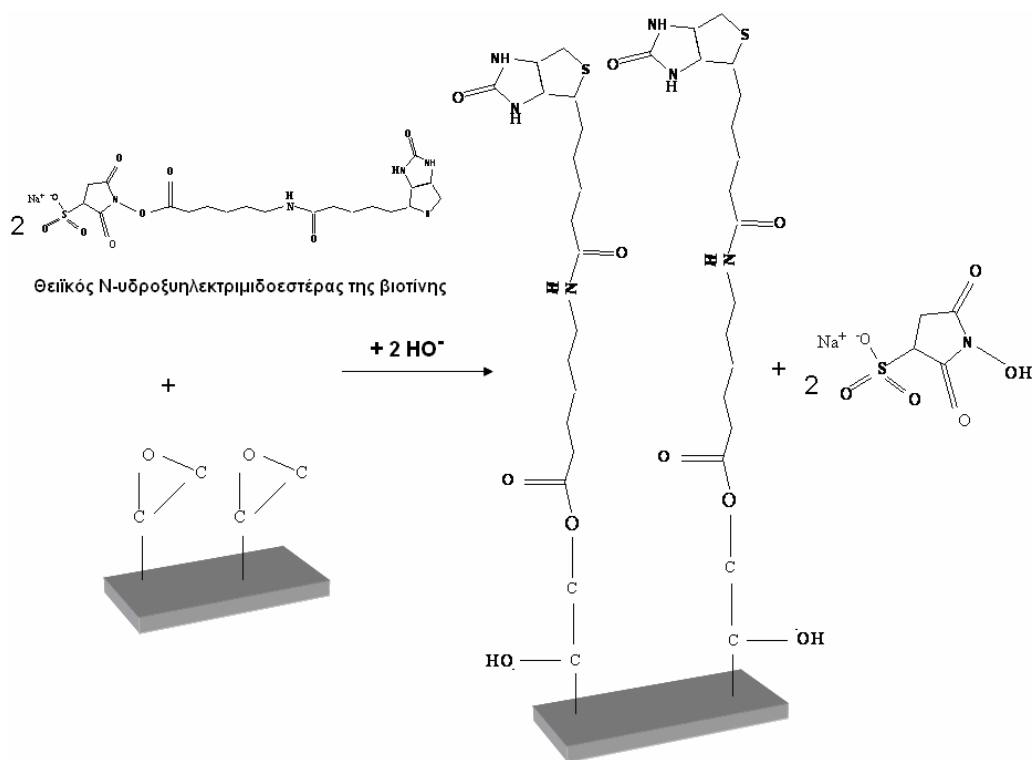
### 1.2.5. Μελέτη της αντίδρασης του θειικού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με τη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR

Η αντίδραση του θειικού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης στην εποξειδική ομάδα δεν έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία. Με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου Κεφαλαίου Γ.1.2.3, προτείνονται δύο πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων είναι δυνατόν να πραγματοποιείται η πρόσδεση του θειικού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης στην εποξειδική ομάδα της εποξειδικής ρητίνης (Σχήματα 107 και 108).

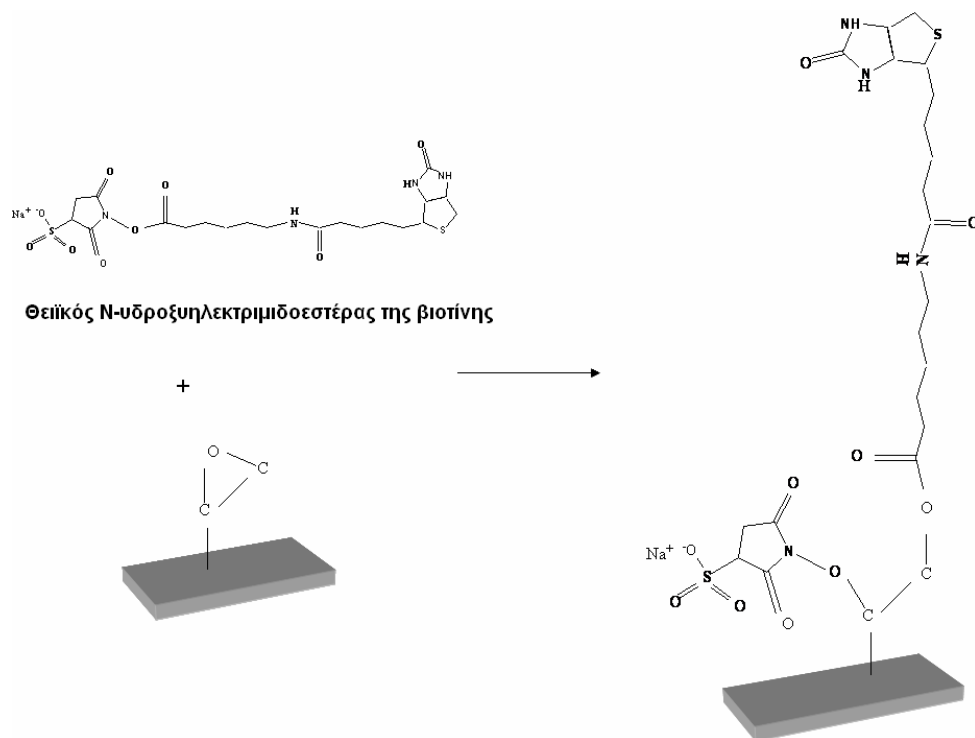
Σύμφωνα με τον μηχανισμό του Σχήματος 107 η πρόσδεση γίνεται με την αποχώρηση της θειϊκής N-υδροξυηλεκτριμιδοομάδας, ενώ σύμφωνα με τον μηχανισμό του Σχήματος 108 η ομάδα αυτή προσδένεται στην εποξειδική ρητίνη.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο μηχανισμός ακινητοποίησης του θειικού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης στην εποξειδική ρητίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Φασματοσκοπίας Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy, ToF-SIMS) (Βλέπε κεφάλαιο Β.2.8). Οι μετρήσεις (Σχήμα 109) πραγματοποιήθηκαν στην Πολωνία στο

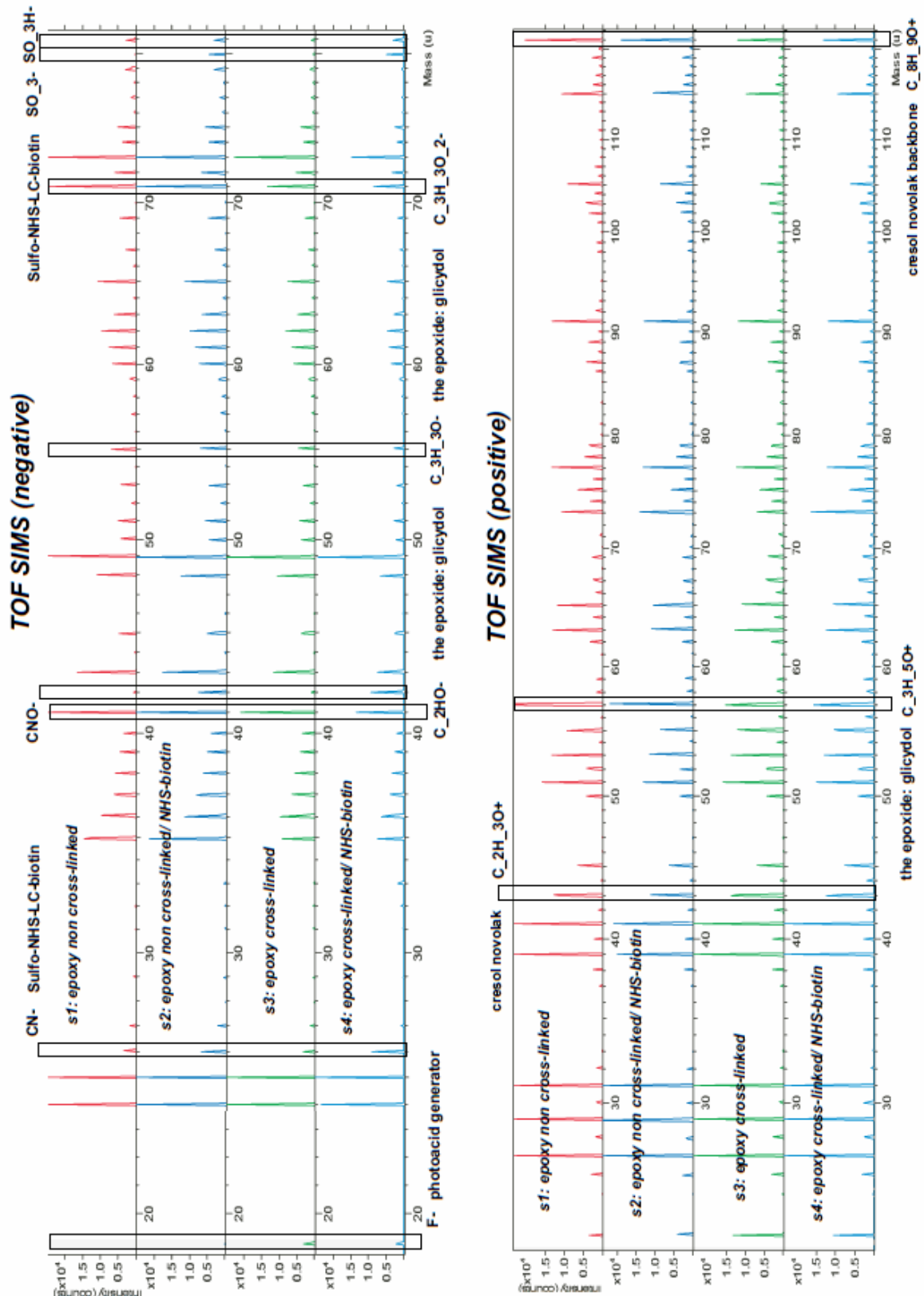
Ινστιτούτο Φυσικής Μ. Smoluchowski του Πανεπιστημίου Jagiellonian, το οποίο βρίσκεται στην Κρακοβία από τον Καθηγητή Andrzej Budkowski.



**Σχήμα 107.** Πρώτος πιθανός μηχανισμός για την αντίδραση του θειικού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με την εποξειδική ομάδα της εποξειδικής ρητίνης με αποχωρούσα ομάδα.



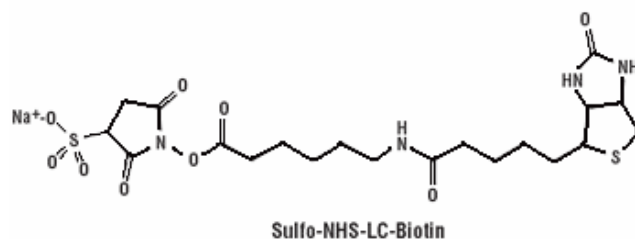
**Σχήμα 108.** Δεύτερος πιθανός μηχανισμός για την αντίδραση του θειικού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με την εποξειδική ομάδα της εποξειδικής ρητίνης.



**Σχήμα 109.** Φάσματα Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πήξης: (s1) εποξειδική ρητίνη, (s2) εποξειδική ρητίνη στην οποία είχε ακινητοποιηθεί ο θεϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης, (s3) διασταυρωμένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη παρουσία εξαφθοροαντιμονικού άλατος του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS) και (s4) διασταυρωμένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη παρουσία TPS στην οποία είχε ακινητοποιηθεί ο θεϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης.

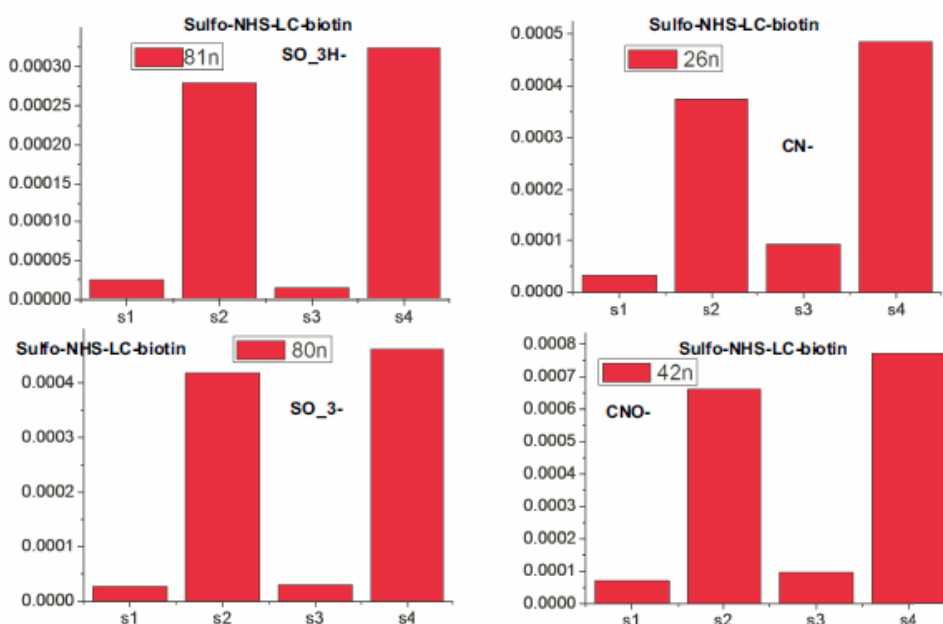
Τα δείγματα που μελετήθηκαν με τη Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης ήταν εποξειδική ρητίνη (s1), εποξειδική ρητίνη στην οποία είχε ακινητοποιηθεί ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (s2), διασταυρωμένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη παρουσία εξαφθοροαντιμονικού άλατος του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS) (s3) και διασταυρωμένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη παρουσία TPS στην οποία είχε ακινητοποιηθεί ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης (s4) (Σχήμα 109).

Προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την ακινητοποίηση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης πρέπει να ταυτοποιηθούν στο Σχήμα 109 οι κορυφές που αντιστοιχούν στα δευτερογενή ιόντα  $CN^-$ ,  $CNO^-$ ,  $SO_3H^-$  και  $SO_3^-$ , τα οποία υπάρχουν μόνο στο θειϊκό N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης. Στο Σχήμα 110 δίνεται η δομή του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης.



**Σχήμα 110.** Συντακτικός τύπος του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης.

Οι κορυφές που αντιστοιχούν στο θειϊκό N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης ( $CN^-$ ,  $CNO^-$ ,  $SO_3H^-$  και  $SO_3^-$ ) εμφανίζονται σε μεγάλη ένταση στα δείγματα στα οποία είχε ακινητοποιηθεί το παράγωγο της βιοτίνης, δηλαδή εμφανίζονται στα δείγματα s2 και s4. (Σχήμα 111). Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 111 η κορυφή 81 αντιστοιχεί στο ανιόν  $SO_3H^-$ , η 80 στο ανιόν  $SO_3^-$ , η 42 στο ανιόν  $CNO^-$  και η 26 στο ανιόν  $CN^-$ .

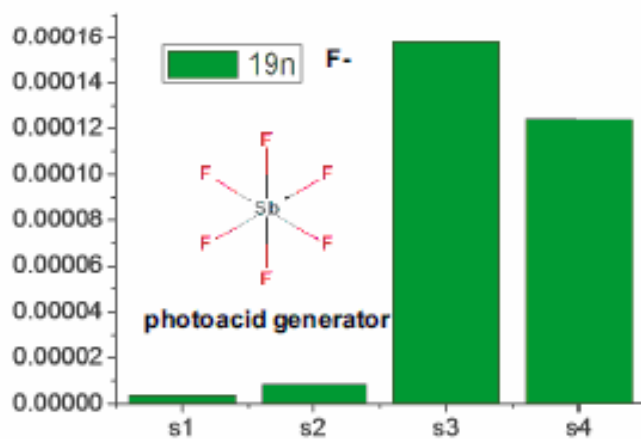


**Σχήμα 111.** Αποτελέσματα που αφορούν την ακινητοποίηση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης.

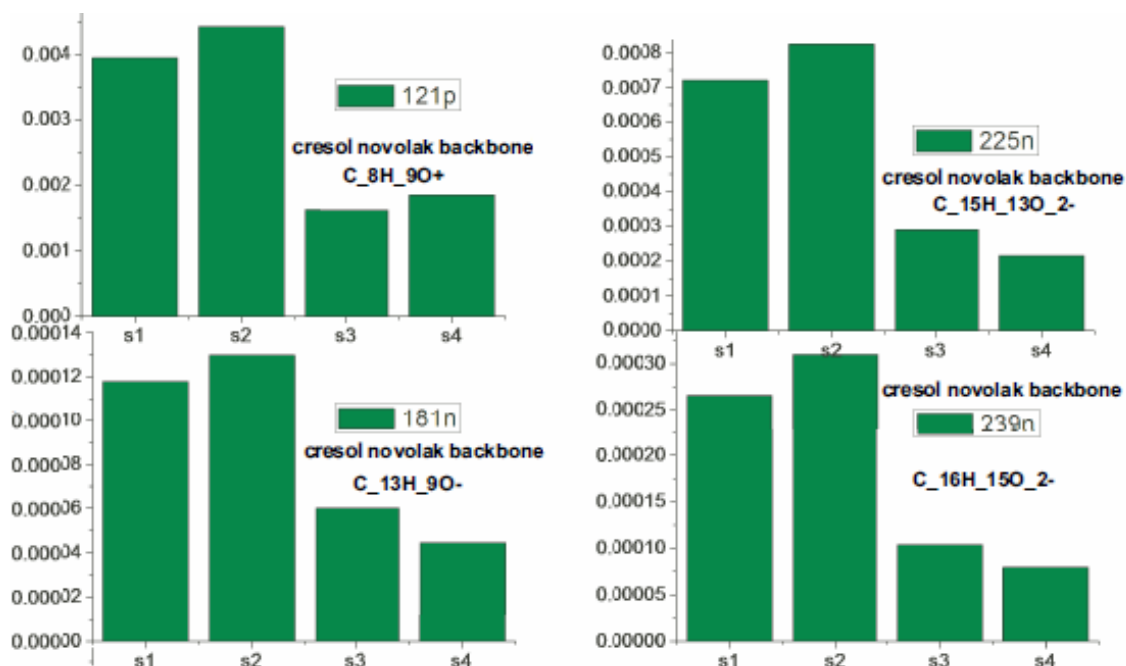


Από το Σχήμα 111 προκύπτει ότι η σουλφονική ομάδα (θραύσμα  $\text{SO}_3\text{H}^-$ ) ακινητοποιείται στην επιφάνεια της εποξειδικής ρητίνης και της φωτοευαίσθητης διασταυρωμένης εποξειδικής ρητίνης. Επομένως η ομάδα που στην περίπτωση αντίδρασης με αμινομάδες (βλ. Σχήμα 95) αποχωρεί στην προκειμένη περίπτωση παραμένει στην επιφάνεια.

Επίσης, έγινε επεξεργασία και άλλων κορυφών για την επιβεβαίωση των συμπερασμάτων. Οι κορυφές που αντιστοιχούν στο εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (Σχήμα 112) εμφανίζονται μόνο στα δείγματα της φωτοευαίσθητης διασταυρωμένης εποξειδικής ρητίνης παρουσία TPS (κορυφή 19 στο Σχήμα 109). Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής TPS υπήρχε μόνο στα διαλύματα με τα οποία επιστρώθηκαν τα συγκεκριμένα δείγματα s3 και s4.

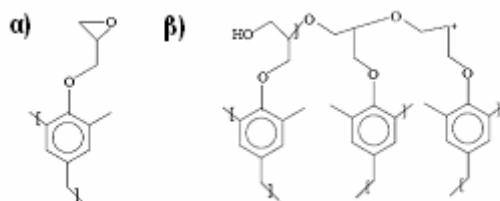


**Σχήμα 112.** Αποτελέσματα που αφορά τη διαφορετική σύσταση της εποξειδικής ρητίνης στα δείγματα ως προς τον φωτοευαισθητοποιητή εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφονίου (TPS).



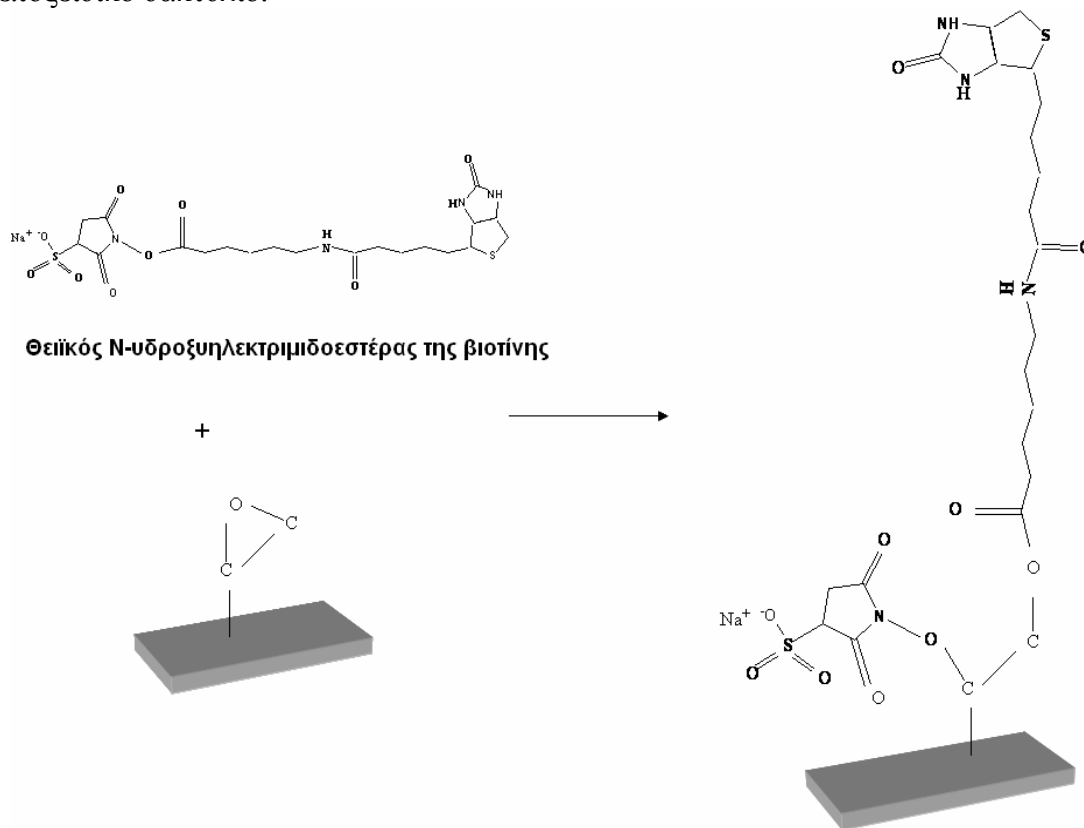
**Σχήμα 113.** Αποτελέσματα που αφορούν την εποξειδική ρητίνη στα δείγματα.

Από το Σχήμα 113 παρατηρείται, γενικώς, ότι τα θραύσματα τα οποία αντιστοιχούν στο κεντρικό κορμό της κρεσόλης (cresol novolak backbone) είναι μειωμένα στη διασταυρωμένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη σε σχέση με την αρχική εποξειδική ρητίνη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στη διασταυρωμένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη έχει δημιουργηθεί πλέγμα και είναι πιο δύσκολο να απελευθερωθούν θραύσματα από το κεντρικό κορμό του πολυμερούς (Σχήμα 114).



**Σχήμα 114.** α) Η αρχική εποξειδική ρητίνη β) Η διασταυρωμένη εποξειδική ρητίνη.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων μάζας δευτερογενών ιόντων ως προς το χρόνο πτήσης, προκύπτει ότι ο πιθανότερος μηχανισμός αντίδρασης τουθειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με τη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR είναι αυτός του Σχήματος 108, ο οποίος αναπαριστάται και στο Σχήμα 115. Επομένως, η ακινητοποίηση τουθειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης πραγματοποιείται με την παράλληλη αντίδραση και ακινητοποίηση τηςθειϊκής N-υδροξυηλεκτριμιδο ομάδας στον εποξειδικό δακτύλιο.

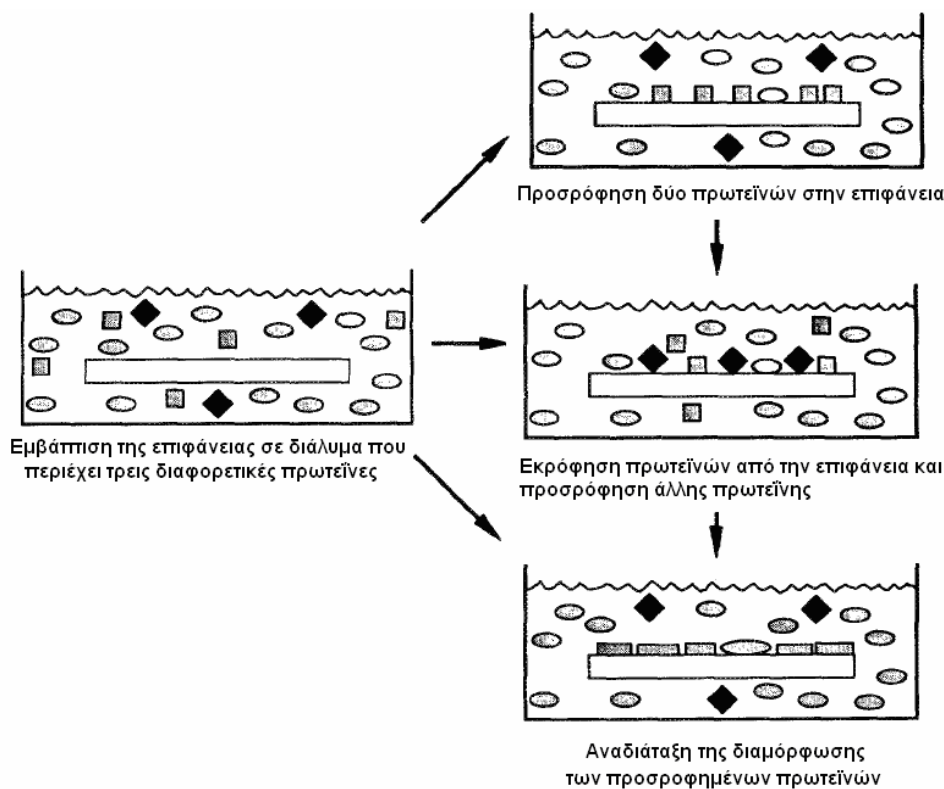


**Σχήμα 115.** Προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση τουθειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με την εποξειδική ρητίνη.

## 2. ΣΧΗΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΣΩ ΥΛΙΚΟΥ ΠΟΥ ΑΠΟΤΡΕΠΕΙ ΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ

Η φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών στις περισσότερες επιφάνειες πραγματοποιείται αυθόρμητα λόγω φαινομένων εντροπίας, αλληλεπιδράσεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου. Προκειμένου να επιτευχθεί η σχηματοποίηση των πρωτεϊνών απαιτείται οι περιοχές που θα αποτρέπουν τη φυσική προσρόφηση να είναι κατάλληλα σχεδιασμένες ώστε η προσρόφηση των πρωτεϊνών σε αυτές να είναι μηδενική, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις σχηματοποίησης πρωτεϊνών όλη η σχηματοποιημένη επιφάνεια εμβαπτίζεται σε διαλύματα πρωτεϊνών. Ακόμα και στις περιπτώσεις που δεν εμβαπτίζεται όλη η επιφάνεια στο διάλυμα της πρωτεΐνης, όπως όταν οι πρωτεΐνες εναποτίθενται στα επιθυμητά σημεία για παράδειγμα μέσω της τεχνικής εγγραφής με μικροεπαφή, είναι επιθυμητό οι περιοχές αποτροπής πρόσδεσης του βιολογικού υλικού να είναι κατάλληλα σχεδιασμένες λόγω της ενδεχόμενης εκρόφησης των πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να συνοδευτεί με την προσρόφηση τους σε άλλα σημεία, γεγονός που μπορεί να συμβεί σε μεταγενέστερα στάδια χρήσης της σχηματοποιημένης επιφάνειας ή λόγω της προσρόφησης πρωτεϊνών από βιολογικά υγρά με τα οποία ενδεχομένως να έρθει σε επαφή η σχηματοποιημένη επιφάνεια κατά την μετέπειτα χρήση.

Σε μία επιφάνεια όταν προσροφώνται πρωτεΐνες τότε μπορούν κάποιες πρωτεΐνες να προσροφηθούν πιο γρήγορα, μπορεί να πραγματοποιηθεί εκρόφηση μιας πρωτεΐνης από την επιφάνεια και να προσροφηθεί μία άλλη και μπορεί να αναδιαταχθεί η διαμόρφωση των προσροφημένων πρωτεϊνών (Σχήμα 116) [221]. Τα φαινόμενα που παρατηρούνται κατά την προσρόφηση πρωτεϊνών σε μία επιφάνεια παρουσιάζονται στο Σχήμα 116.



**Σχήμα 116.** Όταν πρωτεΐνες προσροφώνται σε μία επιφάνεια μπορούν να πραγματοποιηθούν πολλές διεργασίες που εξαρτώνται από το χρόνο [221].

Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά για να μειωθεί η φυσική προσρόφηση πρωτεϊνών είναι η εμβάπτιση της επιφάνειας σε ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αδρανούς πρωτεΐνης, όπως είναι η οροαλβουμίνη βοός, η οποία εναποτίθεται μετά την προσρόφηση της δραστικής πρωτεΐνης για να δεσμεύσει τις θέσεις πρόσδεσης στις οποίες δεν προσδέθηκε η δραστική πρωτεΐνη και να ελαττώσει το ενδεχόμενο προσρόφησης της σε επόμενα στάδια. Η μέθοδος αυτή δεν είναι πάντοτε αποτελεσματική και προσθέτει στάδια στη διεργασία ακινητοποίησης της δραστικής πρωτεΐνης [212].

Επομένως οι επιφάνειες, στις οποίες σχηματοποιούνται οι πρωτεΐνες είναι επιθυμητό να έχουν περιοχές κατάλληλα τροποποιημένες με υλικά που αποτρέπουν τη φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών. Επίσης τα υλικά που αποτρέπουν την προσρόφηση πρωτεϊνών και κυττάρων είναι σημαντικά σε εμφυτεύσιμα υλικά. Για την αποτροπή της πρόσδεσης βιολογικού υλικού, συνήθως, χρησιμοποιούνται υλικά τα οποία στηρίζονται στην πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (Polyethylene Glycol, PEG). Προκειμένου να σχηματοποιηθεί η PEG για να αποτρέπεται η προσρόφηση βιολογικού υλικού σε συγκεκριμένες περιοχές χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι όπως διεργασίες αποκόλλησης (lift-off), η τεχνική της εγγραφής με μικροεπαφή, λιθογραφία με ακίδες σάρωσης, οι οποίες παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο Α.3.

## **2.1. Τροποποίηση της επιφάνειας της εποξειδικής ρητίνης για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών**

### **2.1.1. Επιλογή συστήματος**

Αρχικά στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή το υλικό που μελετήθηκε, προκειμένου να επιτευχθεί η αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών, ήταν η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη (EPR). Το υλικό αυτό επιλέχθηκε διότι διαπιστώθηκε ότι κατά τη διασταύρωση της μπορούν να σχηματιστούν είτε αιθερομάδες είτε υδροξυλομάδες (βλέπε Σχήμα 97). Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Α.1.3.3 έχει προταθεί ότι η αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της επιφάνειας με τα μόρια του νερού. Επομένως, γίνεται η υπόθεση ότι οι αιθερομάδες ή οι υδροξυλομάδες που μπορούν να σχηματιστούν κατά τη διασταύρωση της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης θα αλληλεπιδράσουν με τα μόρια του νερού με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η προσρόφηση των πρωτεϊνών.

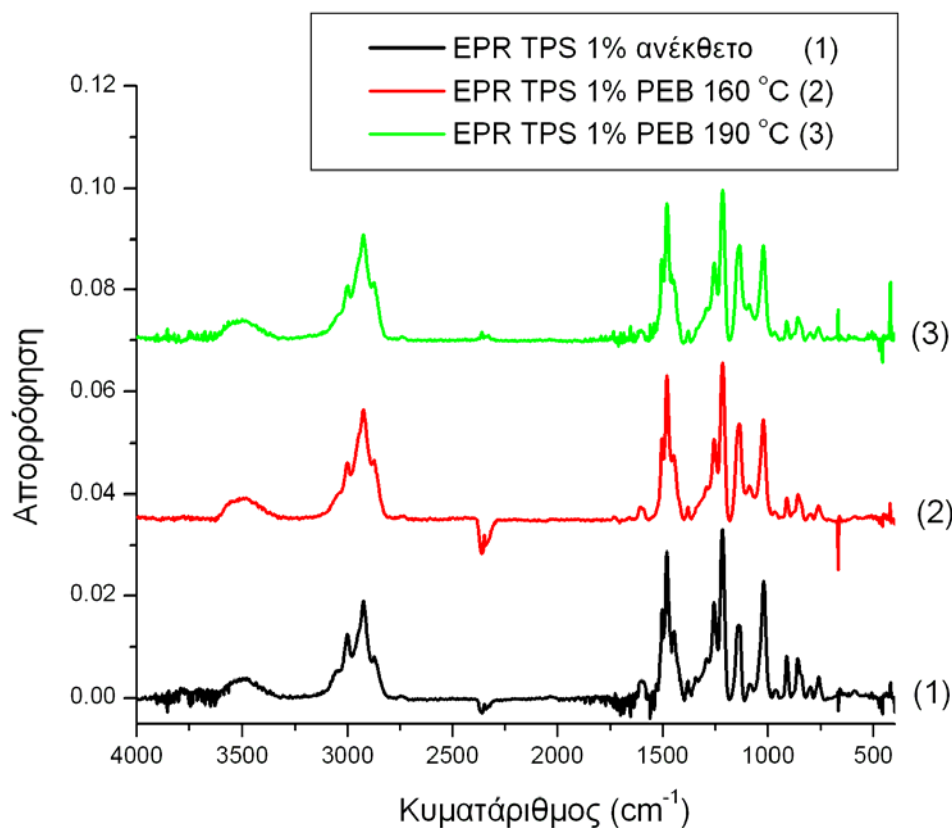
Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η μελέτη η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός. Η οροαλβουμίνη χρησιμοποιείται σε μελέτες φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών λόγω της ύπαρξής της στο αίμα [222].

### **2.1.2. Αποτροπή προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε τροποποιημένα υμένια της εποξειδικής ρητίνης**

Αρχικά μελετήθηκε η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR παρουσία του φωτοευαίσθητοποιητή TPS σε διάφορες συνθήκες διασταύρωσης (έκθεσης και θέρμανσης PEB). Στο συγκεκριμένο πείραμα ο στόχος ήταν να δημιουργηθούν όσο το δυνατό λιγότερες υδροξυλομάδες ( $-OH$ ), οι οποίες προκύπτουν από την αντίδραση του φωτοπαραγωγού οξέος με την εποξειδική ρητίνη (Σχήμα 97), με σκοπό να προχωρήσει όσο το δυνατό περισσότερο ο κατιοντικός πολυμερισμός της εποξειδικής ρητίνης, έτσι ώστε στο τελικό υμένιο να υπάρχουν ελάχιστες υδροξυλομάδες ( $-OH$ ) και να έχει σχηματιστεί αιθέρας, ενώ παράλληλα να έχει πραγματοποιηθεί η

καταστροφή των εποξειδικών δακτυλίων. Μελετήθηκε, λοιπόν, αν ο αιθέρας που σχηματίζεται έχει την ίδια συμπεριφορά με την πολυ(αιθυλενογλυκόλη), δηλαδή αν αποτρέπει την πρόσδεση των πρωτεϊνών.

Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης παρασκευάστηκαν τρία δείγματα (Σχήμα 117): 1) Υμένιο EPR TPS 1% ανέκθετο το οποίο επιστρώθηκε στις 5000 rpm για 1 min από διάλυμα που περιείχε 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη και 1% κ.β. επί των στερεών TPS και ακολούθησε θέρμανση (PAB) στους 90 °C για 3 min. 2) Υμένιο EPR TPS 1% PEB 160 °C που παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί έκθεση 270 s (η έκθεση πραγματοποιήθηκε με φίλτρο στα 249 nm) και θέρμανση PEB στους 160 °C για 3 min. 3) Υμένιο EPR TPS 1% PEB 190 °C που παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί έκθεση 270 s (η έκθεση πραγματοποιήθηκε με φίλτρο στα 249 nm) και θέρμανση PEB στους 190 °C για 3 min.



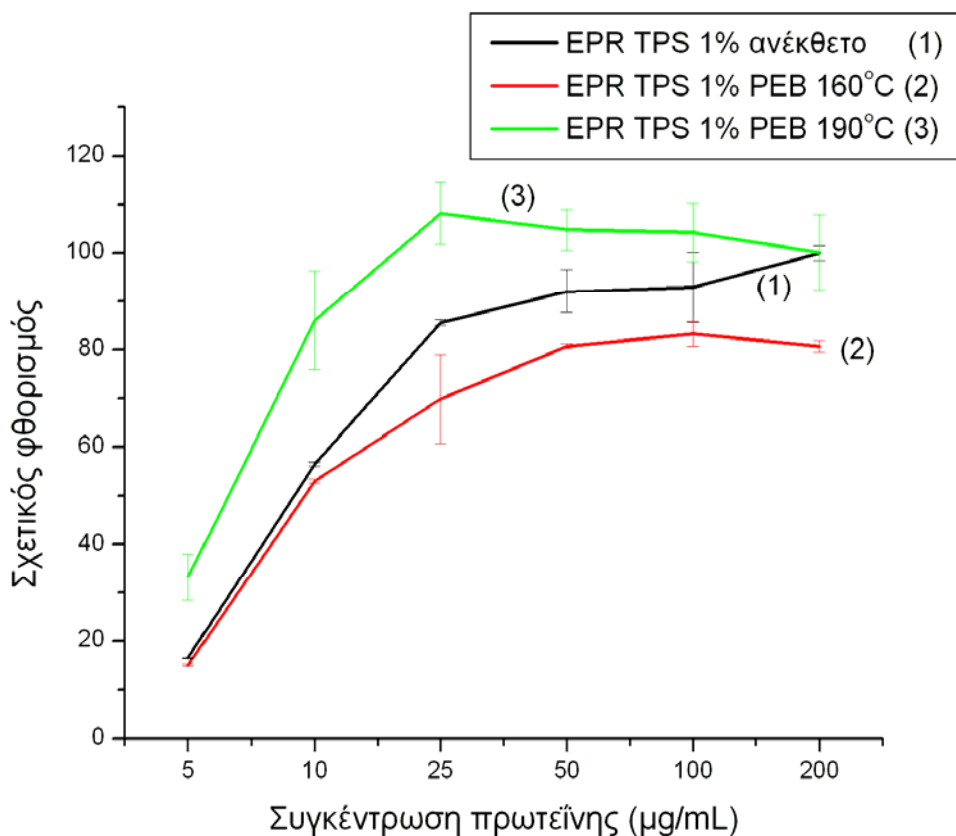
**Σχήμα 117.** Φάσματα υπέρυθρου για το αρχικό υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 1% κ.β. επί των στερεών (1) και για τα διασταυρωμένα υμένια EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 1% κ.β. επί των στερεών μετά από έκθεση και θέρμανση PEB στους 160 °C (2) και στους 190 °C (3).

Όπως προαναφέρθηκε, Κεφάλαιο Γ.1.2.2, η καταστροφή των εποξειδικών δακτυλίων παρακολουθείται με την καταγραφή των φασμάτων υπέρυθρου μέσω της κορυφής στα 3000 cm<sup>-1</sup>, που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης της ομάδας -CH<sub>2</sub>- του εποξειδικού δακτυλίου. Από τα φάσματα υπέρυθρου του Σχήματος 117 παρατηρείται ότι αυτή η κορυφή μειώνεται αρκετά όταν το PEB πραγματοποιείται στους 190 °C.

Προκειμένου να μελετηθεί η προσρόφηση πρωτεϊνών στα υμένια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ακινητοποίησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 118). Συγκεκριμένα στα υμένια εναποτέθηκαν σταγόνες από διαλύματα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός διαφορετικών συγκεντρώσεων για 1 h. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός είχε διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05M και pH 7.4. Στη συνέχεια τα υμένια

ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Κατόπιν εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L. Ακολούθως, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M pH 7.4), το οποίο περιέχει 0.05% v/v Tween-20. Τέλος, ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>.

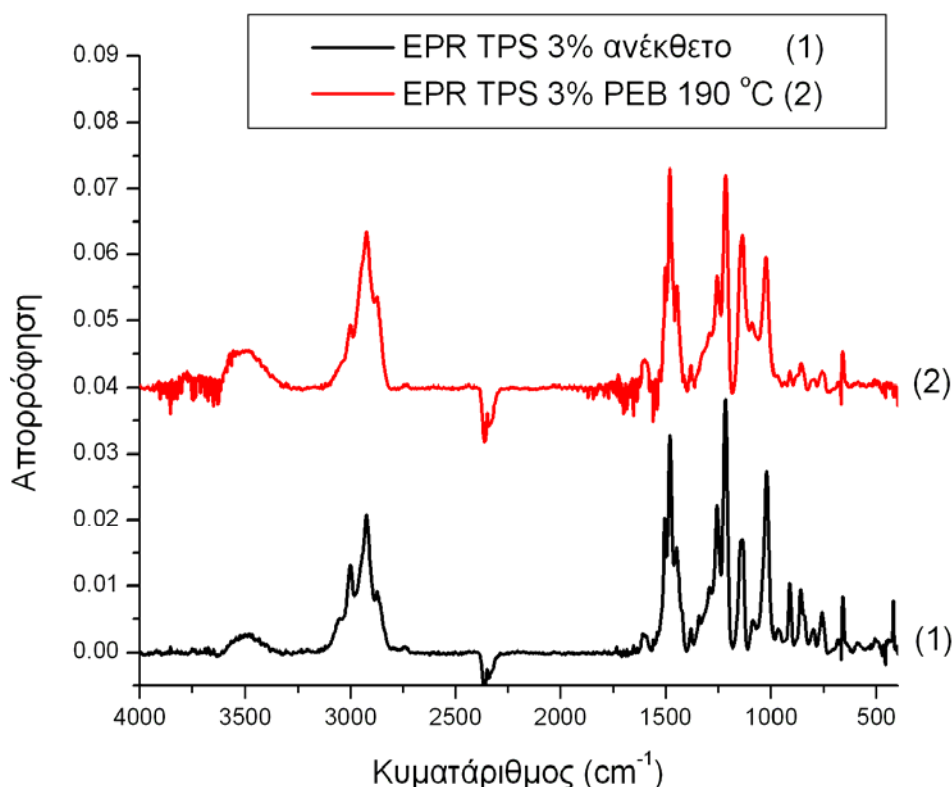
Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 118) παρατηρείται ότι το υμένιο στο οποίο ο σχηματισμός αιθεροομάδων δεν είχε προχωρήσει σε τόσο μεγάλο βαθμό (EPR TPS 1% PEB 160 °C) παρουσίαζε τη χαμηλότερη φυσική προσρόφηση, της οποίας, όμως, η τιμή παρέμενε, ακόμα, αρκετά υψηλή. Επίσης, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός τόσο αυξάνεται ο φθορισμός, ο οποίος είναι ανάλογος της ικανότητας πρόσδεσης του υμενίου, δηλαδή αυξάνεται η προσρόφηση της πρωτεΐνης στο υμένιο.



**Σχήμα 118.** Προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συναρτήσει της συγκέντρωσής της στο αρχικό υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 1% κ.β. επί των στερεών (1) και στα διασταυρωμένα υμένια EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 1% κ.β. επί των στερεών μετά από έκθεση και θέρμανση PEB στους 160 °C (2) και στους 190 °C (3).

Στο επόμενο πείραμα ο στόχος ήταν να καταστραφούν περισσότεροι εποξειδικοί δακτύλιοι σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα. Γι' αυτό αυξήθηκε το ποσοστό του φωτοπαραγωγού οξέος TPS στο 3% κ.β. επί των στερεών και επιλέχθηκε η υψηλότερη θερμοκρασία για το PEB (190 °C) για να προχωρήσει όσο το δυνατό

περισσότερο ο κατιοντικός πολυμερισμός. Η θερμοκρασία του PEB είναι η μέγιστη δυνατή, γιατί πάνω από αυτή ξεκινά η θερμική διάσπαση του φωτοπαραγωγού οξέος TPS. Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης παρασκευάστηκαν δύο δείγματα (Σχήμα 119): 1) Υμένιο EPR TPS 3% ανέκθετο το οποίο επιστρώθηκε στις 5000 rpm για 1 min από διάλυμα που περιείχε 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη και 3% κ.β. επί των στερεών TPS και ακολούθησε θέρμανση (PAB) στους 90 °C για 3 min. 2) Υμένιο EPR TPS 3% PEB 190 °C που παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί έκθεση 270 s (η έκθεση πραγματοποιήθηκε με φίλτρο στα 249 nm) και θέρμανση PEB στους 190 °C για 3 min.

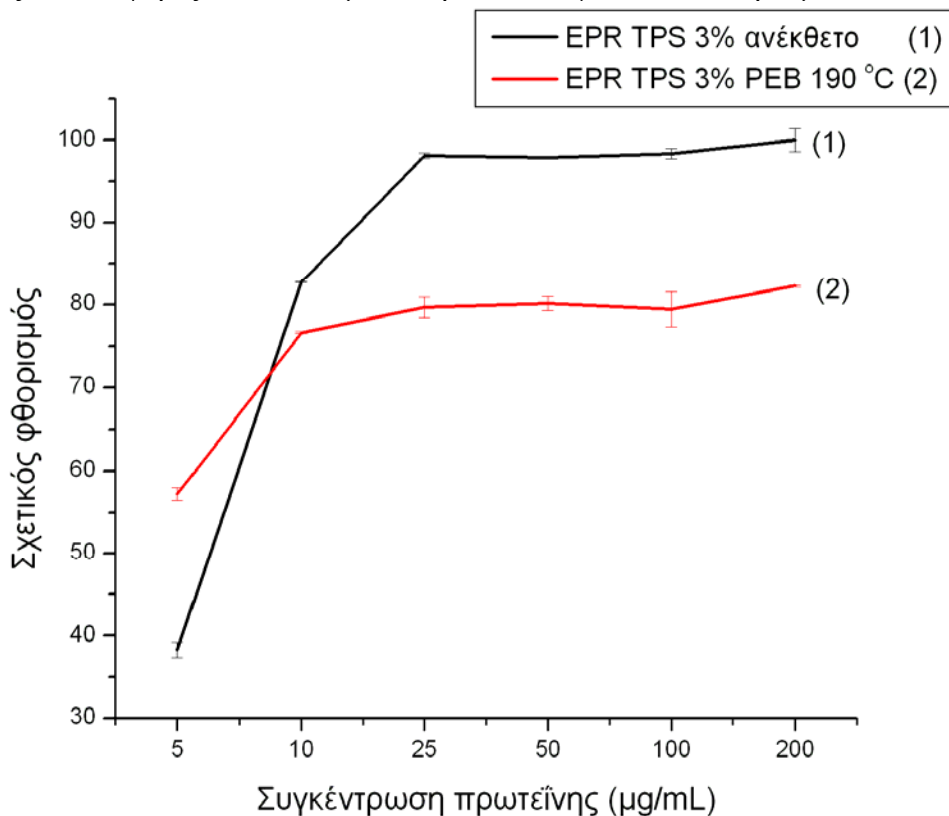


**Σχήμα 119.** Φάσματα υπεράυθρου για το αρχικό υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 3% κ.β. επί των στερεών (1) και για το διασταυρωμένο υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 3% κ.β. επί των στερεών μετά από έκθεση και θέρμανση PEB στους 190 °C (2).

Από τα φάσματα υπεράυθρου του Σχήματος 119 παρατηρείται ότι η κορυφή στα 3000  $\text{cm}^{-1}$ , η οποία όπως προαναφέρθηκε αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης της ομάδας  $-\text{CH}_2-$  του εποξειδικού δακτυλίου, σχεδόν εξαφανίζεται στο δείγμα του διασταυρωμένου υμενίου EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 3% κ.β. επί των στερεών το οποίο έχει υποστεί έκθεση και θέρμανση (PEB) στους 190°C.

Για να μελετηθεί η προσρόφηση πρωτεϊνών στα υμένια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ακινητοποίησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 120). Συγκεκριμένα στα υμένια εναποτέθηκαν σταγόνες από διαλύματα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός διαφορετικών συγκεντρώσεων για 1 h. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός είχε διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Ακολούθως, εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$

επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βόος συγκέντρωσης 10 g/L. Τέλος τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M pH 7.4), το οποίο περιέχει 0.05% v/v Tween-20. Κατόπιν τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>.



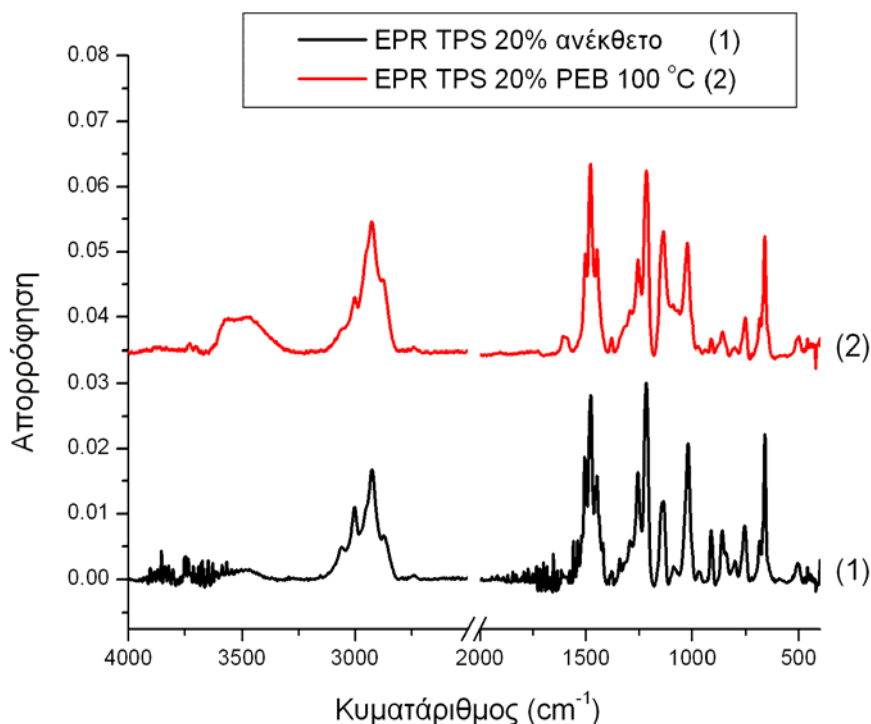
**Σχήμα 120.** Προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βόος συναρτήσεως της συγκέντρωσής της στο αρχικό υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 3% κ.β. επί των στερεών (1) και στο διασταυρωμένο υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 3% κ.β. επί των στερεών μετά από έκθεση και θέρμανση PEB στους 190 °C (2).

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσρόφησης παρατηρείται ότι το υμένιο στο οποίο πραγματοποιήθηκε ο κατιοντικός πολυμερισμός που οδηγεί στη δημιουργία αιθερομάδων παρουσίαζε μικρότερη φυσική προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βόος σε σχέση με το αρχικό, αλλά αυτή εξακολουθούσε να παραμένει ακόμη πολύ αυξημένη (Σχήμα 120).

Εφόσον, η προσπάθεια αποτροπής της φυσικής προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βόος, μέσω του σχηματισμού αιθερομάδων δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα, στην επόμενη προσπάθεια ο στόχος ήταν να δημιουργηθούν όσο το δυνατό περισσότερες υδροξυλομάδες (–OH), οι οποίες θα αλληλεπιδράσουν με τα μόρια του νερού και θα οδηγήσουν στην αποτροπή της φυσικής προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βόος. Για να δημιουργηθούν περισσότερες –OH χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό φωτοπαραγωγού οξέος TPS. Συγκεκριμένα, το ποσοστό του TPS ήταν 20% κ.β. επί των στερεών. Παρασκευάστηκαν δύο δείγματα (Σχήμα 121): 1) Υμένιο EPR TPS 20% ανέκθετο το οποίο επιστρώθηκε στις 5000 rpm για 1 min από διάλυμα που περιείχε 19% κ.β. εποξειδική ρητίνη και 20% κ.β. επί των στερεών TPS και ακολούθησε θέρμανση (PAB) στους 90 °C για 3 min. 2) Υμένιο EPR TPS 20% PEB 100 °C που παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί έκθεση 540



s (η έκθεση πραγματοποιήθηκε με φίλτρο στα 249 nm) και θέρμανση PEB στους 100 °C για 3 min.

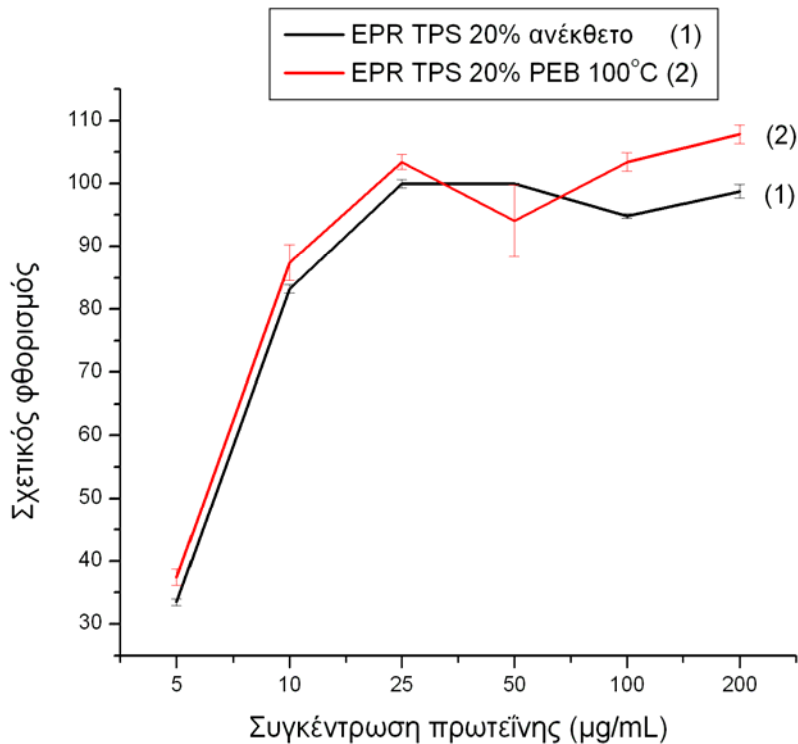


**Σχήμα 121.** Φάσματα υπερώθρου για το αρχικό υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 20% κ.β. επί των στερεών (1) και για το διασταυρωμένο υμένιο EPR παρουσία TPS σε ποσοστό 20% κ.β. επί των στερεών μετά από έκθεση και θέρμανση PEB στους 100 °C (2).

Στα φάσματα υπερώθρου του Σχήματος 121 παρατηρείται η αύξηση της κορυφής στα 3500 cm<sup>-1</sup>, που αντιστοιχεί στις υδροξυλομάδες (-OH). Επίσης παρατηρείται η εξαφάνιση της κορυφής στα 3000 cm<sup>-1</sup>, που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης της ομάδας -CH<sub>2</sub>- του εποξειδικού δακτυλίου, γεγονός αναμενόμενο, αφού ο κατιοντικός πολυμερισμός εκκινείται από περισσότερα σημεία.

Για να μελετηθεί η προσρόφηση πρωτεϊνών στα υμένια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ακινητοποίησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 122). Συγκεκριμένα, στα υμένια εναποτέθηκαν σταγόνες από διαλύματα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός διαφορετικών συγκεντρώσεων για 1 h. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός είχε διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Έπειτα, εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L. Ακολούθως, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M pH 7.4), το οποίο περιέχει 0.05% v/v Tween-20. Τέλος, ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός παρατηρείται ότι τα δύο υμένια παρουσιάζουν ανάλογη ικανότητα προσρόφησης (Σχήμα 122).



**Σχήμα 122.** Προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συναρτήσεως της συγκέντρωσής της στο αρχικό υμένιο ΕΡΡ παρουσία ΤΡΡ σε ποσοστό 20% κ.β. επί των στερεών (1) και στο διασταυρωμένο υμένιο ΕΡΡ παρουσία ΤΡΡ σε ποσοστό 20% κ.β. επί των στερεών μετά από έκθεση και θέρμανση ΡΕΒ στους 100 °C (2).

Επομένως, η προσπάθεια για την αποτροπή της προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στην εποξειδική ρητίνη, μέσω της δημιουργίας αιθερομάδων ή μέσω της δημιουργίας υδροξυλομάδων, δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Το πιο πιθανό είναι ότι οι πρωτεΐνες προσροφώνται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στους αρωματικούς δακτυλίους της εποξειδικής ρητίνης. Γι' αυτό το λόγο, στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η πολυ(βινυλική αλκοόλη), ένα υδρόφιλο υλικό, το οποίο περιέχει πολλές υδροξυλομάδες (–OH), αλλά καθόλου αρωματικούς δακτυλίους.

## 2.2. Μελέτη υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών

### 2.2.1. Επιλογή συστήματος

Η πολυ(βινυλική αλκοόλη) (Poly(vinyl alcohol), PVA) είναι ένα υδρόφιλο πολυμερές, καθώς διαθέτει πολλές υδροξυλομάδες, όπως και η πολυ(αιθυλενογλυκόλη). Επίσης, είναι ένα βιοσυμβατό υλικό το οποίο προτείνεται για χρήση σε τεχνητά όργανα [223], σε stent βαλβίδας καρδιάς [224], σε φακούς επαφής [225], και στη μεταφορά φαρμάκων [226, 227]. Ακόμη, η PVA είναι ένα υλικό το οποίο δεν παρουσιάζει φθορισμό, το οποίο είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό επειδή η ανίχνευση των πρωτεϊνών σε πολλές διαγνωστικές συσκευές γίνεται μέσω φθορισμού [187].

Ο Barrett και οι συνεργάτες του μελέτησαν την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών στην πολυ(βινυλική αλκοόλη) μέσω της μεθόδου του συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων [61]. Συγκεκριμένα, η πολυ(βινυλική

αλκοόλη) προσροφήθηκε σε λεπτά υμένα πολυστυρενίου. Παρατηρήθηκε ότι η ανθρώπινη οροαλβουμίνη δεν ακινητοποιήθηκε στις επιφάνειες του πολυστυρενίου που είχαν τροποποιηθεί με την πολυ(βινυλική αλκοόλη) στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν μεγάλες συγκεντρώσεις διαλυμάτων PVA. Όμως όταν χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα PVA μικρής συγκέντρωσης (0.001mg/mL) η ανθρώπινη οροαλβουμίνη εκτόπιζε την προσροφημένη PVA με αποτέλεσμα να ακινητοποιείται στην επιφάνεια του πολυστυρενίου.

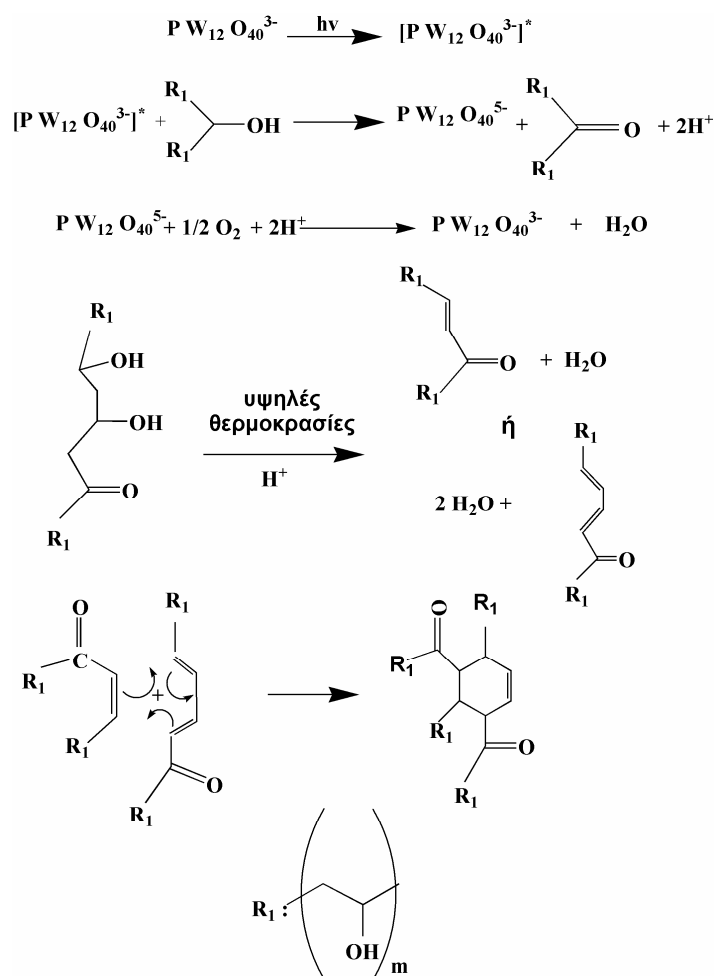
Γι' αυτό, προκειμένου η πολυ(βινυλική αλκοόλη) να είναι ανθεκτική, όταν έρχεται σε επαφή με βιολογικά υγρά ή με υδατικά διαλύματα, είναι επιθυμητή η διασταύρωσή της. Η διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) εφαρμόζεται στην κατασκευή μεμβρανών πολυ(βινυλικής αλκοόλης). Η διασταύρωση των μεμβρανών πολυ(βινυλικής αλκοόλης) γίνεται με φυσικούς και με χημικούς τρόπους. Φυσικός τρόπος διασταύρωσης της PVA είναι η δημιουργία κρυσταλλικών περιοχών μέσω της πραγματοποίησης κύκλων θέρμανσης και ψύξης σε υδατικά διαλύματα PVA. Οι κρυσταλλικές περιοχές που δημιουργούνται δρουν σαν διασταυρωτές [228]. Ένας άλλος φυσικός τρόπος διασταύρωσης είναι η θέρμανση 100% υδρολυμένης PVA για 30-80 min στους 120-175 °C, η οποία οδηγεί σε δημιουργία διπλών δεσμών, σπάσιμο της πολυμερικής αλυσίδας και δικτύωση [229]. Χημικός τρόπος διασταύρωσης της PVA είναι μέσω αντίδρασης με φορμαλδεϋδη παρουσία όξινου καταλύτη [230]. Ένας άλλος χημικός τρόπος διασταύρωσης είναι μέσω αφυδάτωσης, η οποία πραγματοποιείται παρουσία θειϊκού οξέος (καταλύτης) και σε θερμοκρασίες 100-125 °C για 10-30 min [231]. Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή η διασταύρωση της PVA είναι επιθυμητό να επιτευχθεί μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η διασταύρωσή της σε συγκεκριμένες περιοχές μέσω φωτολιθογραφίας.

### **2.2.2. Ανάπτυξη φωτολιθογραφικής μεθόδου με βάση την πολυ(βινυλική αλκοόλη) για εφαρμογή σε βιοαναλυτικές διεργασίες**

Η φωτολιθογραφική διεργασία της PVA είχε αναπτυχθεί για να εφαρμοστεί σε μικροηλεκτρονικές διατάξεις [149, 150]. Το φωτοευαίσθητο υμένιο έχει εφαρμοστεί για τη μεταφορά σχήματος [149] και την εναπόθεση νικελίου [150]. Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Α. 2.2.3.1.3 η φωτολιθογραφική διεργασία στηρίζεται σε υμένιο PVA που περιείχε τη φωτοευαίσθητη πολυοξομεταλλική ένωση (ΠΟΜ) 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η τροποποίηση της φωτολιθογραφικής διεργασίας της διασταύρωσης της PVA, η οποία έχει εφαρμοστεί σε μικροηλεκτρονικές διατάξεις [149, 150] προκειμένου να εφαρμοστεί για την επιλεκτική πρόσδεση πρωτεϊνών και κυττάρων.

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο Α.2.2.3.1.3 η διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) πραγματοποιείται μέσω της φωτοχημικής αντίδρασης με το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ. Αναλυτικότερα, η διασταύρωση της PVA εκκινείται με τη φωτοδιέγερση της ΠΟΜ  $PW_{12}O_{40}^{3-}$ , και την αντίδραση της διεγερμένης ΠΟΜ  $[PW_{12}O_{40}^{3-}]^*$  με την PVA, η οποία προκαλεί τη φωτοαναγωγή της ΠΟΜ προς  $PW_{12}O_{40}^{4-}$  και  $PW_{12}O_{40}^{5-}$  και την οξείδωση των υδροξυλομάδων,  $-OH$ , της PVA προς καρβονυλομάδες [152]. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα αφυδάτωση σε όξινο περιβάλλον και σε υψηλές θερμοκρασίες (στάδιο θέρμανσης μετά την έκθεση (PEB) στους 88 °C). Ακολούθως, μέσω αντιδράσεων Diels Alder ενώνονται οι αλυσίδες του πολυμερούς, με αποτέλεσμα τη διασταύρωση της PVA (Σχήμα 123) [149].



**Σχήμα 123.** Αντιδράσεις που οδηγούν στη διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) μέσω της φωτοχημικής αντίδρασης με την πολυοξομεταλλική ένωση 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) [149].

Είναι αξιοσημείωτο να παρατηρηθεί ότι η θερμοκρασία που εφαρμόζεται (88 °C για 3 min) είναι μικρότερη από τη θέρμανση στους 120 °C-175 °C για 30-80 min που απαιτείται για τη διασταύρωση της PVA με φυσικό τρόπο. Επομένως με την προτεινόμενη διεργασία η διασταύρωση της PVA πραγματοποιείται μόνο στις εκτεθειμένες περιοχές και όχι στις ανέκθετες. Τέλος, το στάδιο της εμφάνισης τροποποιήθηκε έτσι ώστε σε αυτό το στάδιο να απομακρυνθούν οι ανέκθετες περιοχές αλλά ταυτόχρονα να απομακρυνθεί και η POM από την πολυμερική μήτρα. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου είναι ιδιαίτερα σημαντικό να καταναλωθούν όσο το δυνατόν λιγότερες υδροξυλομάδες για την επίτευξη της διασταύρωσης, έτσι ώστε το τελικό υμένιο να περιέχει πολλές υδροξυλομάδες, να είναι ανθεκτικό σε υδατικά διαλύματα και να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση της POM.

### 2.2.2.1. Σύγκριση υμενίων διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης)

#### 2.2.2.1.1. Επιλογή του ποσοστού υδρόλυσης της πολυ(βινυλικής αλκοόλης)

Παρασκευάστηκαν και συγκρίθηκαν υμένια PVA που είχαν προκύψει από διαλύματα PVA με διαφορετικό ποσοστό υδρόλυσης στα οποία είχε προστεθεί και το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε PVA υδρολυμένη σε ποσοστό 98% και 87%. Παρατηρήθηκε ότι μετά την ολοκλήρωση της λιθογραφικής διεργασίας υμενίου που προέκυψε από διάλυμα PVA 87% υδρολυμένης παρουσία της

ΠΟΜ, στις ανέκθετες περιοχές παρέμενε ένα υμένιο το οποίο δεν απομακρύνεται κατά το στάδιο της εμφάνισης με απιονισμένο νερό. Όταν πραγματοποιήθηκε η λιθογραφία υμενίου που προέκυψε από διάλυμα PVA 98% υδρολυμένης παρουσία της ΠΟΜ οι ανέκθετες περιοχές απομακρύνονται κατά το στάδιο της εμφάνισης με απιονισμένο νερό.

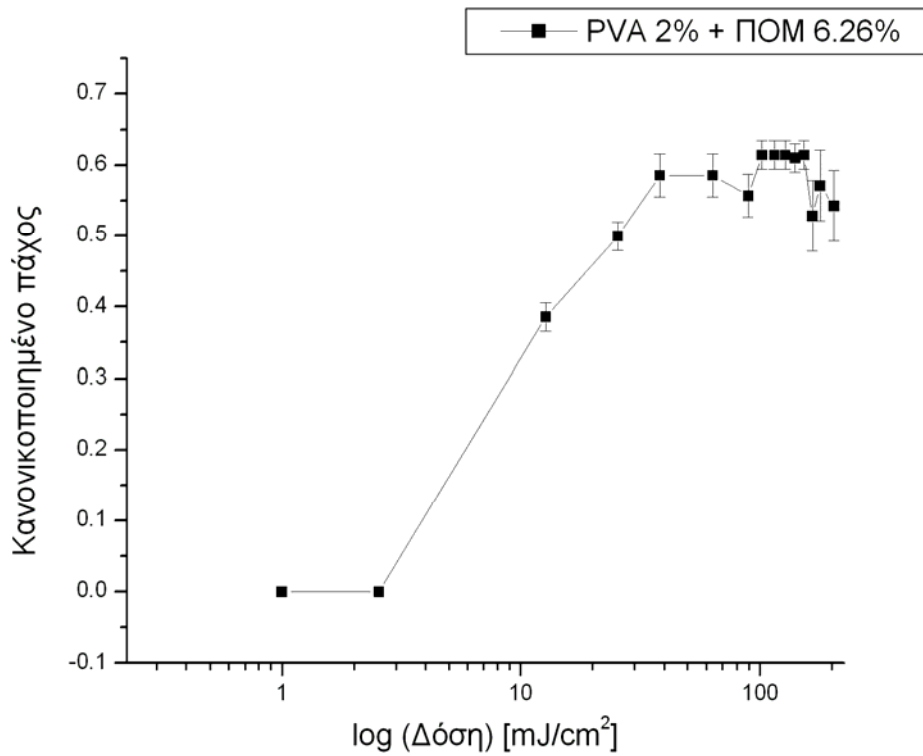
Επίσης παρατηρήθηκε ότι σε λιθογραφημένα υμένια, που προέκυψαν από διαλύματα PVA 87% υδρολυμένης παρουσία της ΠΟΜ, τα οποία είχαν αποθηκευτεί για περισσότερες από 2 ημέρες, οι ανέκθετες περιοχές απομακρύνονταν κατά το στάδιο της εμφάνισης με απιονισμένο νερό. Μετά από αυτές τις παρατηρήσεις το υμένιο που δημιουργήθηκε στις ανέκθετες περιοχές αποδόθηκε στην παρουσία του πολυ(οξικού βινυλεστέρα) που υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό στο αρχικό διάλυμα που περιέχει PVA 87% υδρολυμένη. Το υμένιο αυτό δεν σχηματιζόταν σε λιθογραφημένα υμένια που προέκυπταν από διαλύματα PVA 87% υδρολυμένης παρουσία της ΠΟΜ όταν αυτά είχαν αποθηκευτεί για 2 και περισσότερες μέρες, γιατί ο πολυ(οξικός βινυλεστέρας) δεν υπήρχε σε αυτά τα διαλύματα, καθώς λάμβανε χώρα όξινη υδρόλυση λόγω της παρουσίας του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος στα διαλύματα, η οποία είχε σαν αποτέλεσμα την μετατροπή του πολυ(οξικού βινυλεστέρα) σε πολυ(βινυλική αλκοόλη). Προκειμένου τα αποτελέσματα της μελέτης να είναι επαναλήψιμα και οι συνθήκες ελεγχόμενες επιλέχθηκε τα διαλύματα να παρασκευάζονται με PVA 98% υδρολυμένη.

#### **2.2.2.1.2. Περιεκτικότητα των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) σε 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ**

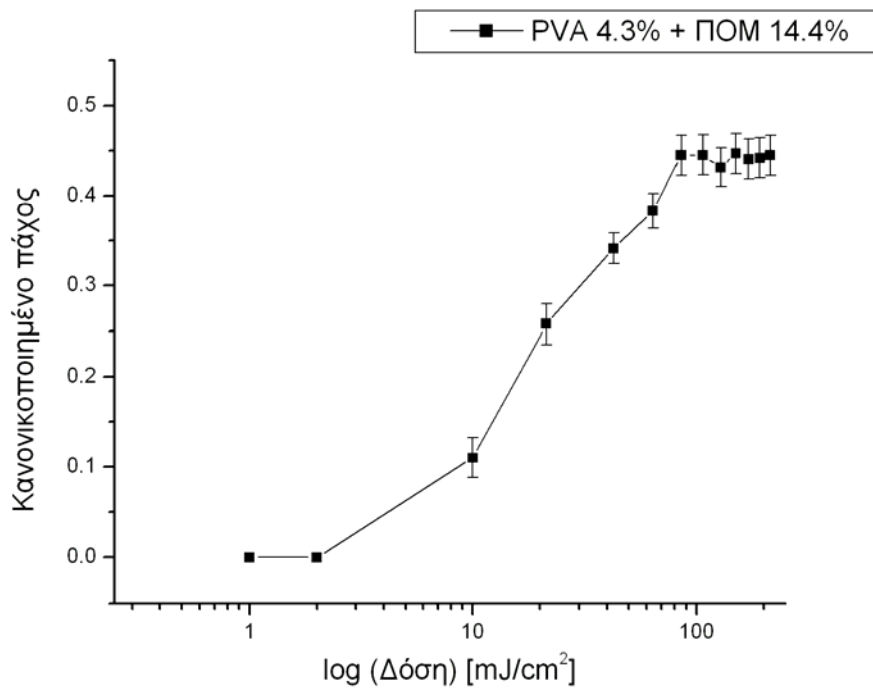
Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες διαλυμάτων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) 98% υδρολυμένης και 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (ΠΟΜ). Το πρώτο διάλυμα περιείχε 2% κ.β. PVA και 6.26% κ.β. ΠΟΜ, το δεύτερο περιείχε 4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ και το τρίτο διάλυμα περιείχε 8.2% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ. Στο διάλυμα με περιεκτικότητα 2% κ.β. PVA και 6.26% κ.β. ΠΟΜ αντιστοιχεί 1mol ΠΟΜ σε κάθε 20 μονομερή της PVA. Η ίδια αναλογία υπάρχει στο διάλυμα PVA 4.3% κ.β. και ΠΟΜ 14.4% κ.β. Στο διάλυμα που περιέχει 8.2% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ αντιστοιχεί 1mol ΠΟΜ για κάθε 30 μονομερή της PVA. Τα τρία διαλύματα μελετήθηκαν για να διαπιστωθεί η επίδραση της περιεκτικότητας της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) στην υδροφιλικότητα των διασταυρωμένων υμενίων και στη λιθογραφική συμπεριφορά των υλικών.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι καμπύλες αντίθεσης των διαφορετικών διαλυμάτων της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) και του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (ΠΟΜ) που χρησιμοποιείται ως φωτοευαίσθητη ουσία. Τα διαλύματα επιστρώθηκαν στις 4000 rpm για 30 sec σε επιφάνεια πυριτίου. Ακολούθησε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκθεση σε διαφορετικές δόσεις σε ακτινοβολία UV με φίλτρο στα 254 nm με στενή ζώνη φάσματος 50 nm. Ακολούθησε θέρμανση PEB στους 88 °C για 3 min. Η εμφάνιση έγινε με απιονισμένο νερό για 2 min. Στα Σχήματα 124, 125 και 126 παρατίθενται οι καμπύλες αντίθεσης για τα υμένια που προέκυψαν από τα τρία διαλύματα PVA και ΠΟΜ.

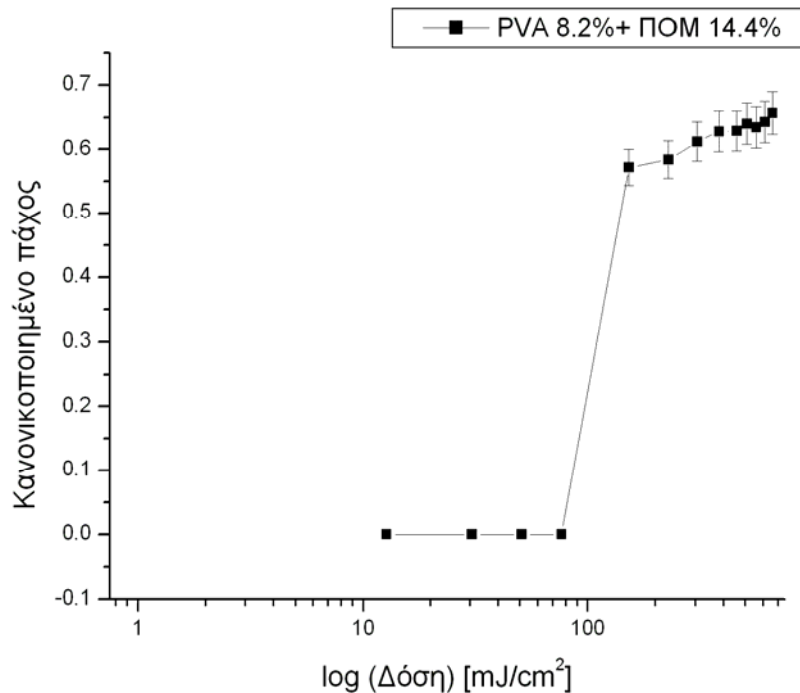
Από τις καμπύλες αντίθεσης παρατηρείται ότι το διάλυμα που περιέχει 8.2% PVA και 14.4% ΠΟΜ (Σχήμα 126) χρειάζεται μεγαλύτερες δόσεις έκθεσης για να επιτευχθεί ο σχηματισμός του πλέγματος. Αυτό είναι αναμενόμενο γιατί σε αυτό το διάλυμα σε κάθε 30 μονομερή της PVA αντιστοιχεί 1mol ΠΟΜ. Επίσης, παρατηρείται σε όλες τις καμπύλες αντίθεσης (Σχήματα 124, 125, 126) ότι το τελικό πάχος των υμενίων είναι ένα ποσοστό του αρχικού πάχους, πράγμα που οφείλεται στην απομάκρυνση της ΠΟΜ κατά τη διάρκεια της εμφάνισης.



**Σχήμα 124.** Καμπύλη αντίθεσης υμενίου που προκύπτει από επίστρωση διαλύματος που περιέχει 2% PVA και 6.26% POM.



**Σχήμα 125.** Καμπύλη αντίθεσης υμενίου που προκύπτει από επίστρωση διαλύματος που περιέχει 4.3% PVA και 14.4% POM.



**Σχήμα 126.** Καμπύλη αντίθεσης υμενίου που προκύπτει από επίστρωση διαλύματος που περιέχει 8.2% PVA και 14.4% POM.

Από τις καμπύλες αντίθεσης παρατηρείται ότι για το υμένιο που προκύπτει από το διάλυμα που περιέχει 2% PVA και 6.26% POM (Σχήμα 124) το τελικό πάχος του υμενίου είναι το 50% του αρχικού πάχους και για το διάλυμα που περιέχει 4.3% PVA και 14.4% POM (Σχήμα 125) το τελικό πάχος του υμενίου είναι το 45% του αρχικού πάχους, δηλαδή τα υμένια που προκύπτουν από τα διαλύματα που έχουν την αναλογία 1mol POM για κάθε 20 μονομερή της PVA έχουν σχεδόν την ίδια απώλεια πάχους στο τελικό υμένιο λόγω της απομάκρυνσης της POM, ενώ για το διάλυμα που περιέχει 8.2% PVA και 14.4% POM (Σχήμα 126) που προκύπτει από διάλυμα όπου 1mol POM αντιστοιχεί σε κάθε 30 μονομερή της PVA το τελικό πάχος του υμενίου είναι το 67% του αρχικού πάχους, δηλαδή η απώλεια σε πάχος είναι μικρότερη σε σχέση με τα άλλα δύο. Στον Πίνακα 6 παρατίθεται το αρχικό και το τελικό πάχος των υμενίων.

**Πίνακας 6.** Πάχη μετά το PAB και μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό των διασταυρωμένων υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) που παρασκευάστηκαν από τρία διαλύματα PVA και POM.

Διάλυμα	Πάχος υμενίου μετά το PAB (αρχικό πάχος) (nm)	Πάχος υμενίου μετά την εμφάνιση (nm)
PVA 8.2%+POM 14.4% (% κ.β.)	382	255
PVA 4.3%+POM 14.4% (% κ.β.)	141	63
PVA 2%+POM 6.26% (% κ.β.)	36	19

Ακολούθως, επειδή ήταν πολύ σημαντικό να προσδιοριστεί η υδροφιλικότητα των διασταυρωμένων υμενίων, προκειμένου να επιλεγεί το υμένιο στο οποίο θα διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα και θα χρησιμοποιηθεί τελικώς στην επιλεκτική

φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών, μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής των τριών διασταυρωμένων υμενίων PVA στη λιθογραφική δόση (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.** Γωνίες επαφής των διασταυρωμένων υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) στη λιθογραφική δόση που παρασκευάστηκαν από τα τρία διαλύματα PVA και POM.

Διάλυμα	Γωνίες επαφής
PVA 8.2%+POM 14.4% (% κ.β.)	57°
PVA 4.3%+POM 14.4% (% κ.β.)	60°
PVA 2%+POM 6.26% (% κ.β.)	56.5°

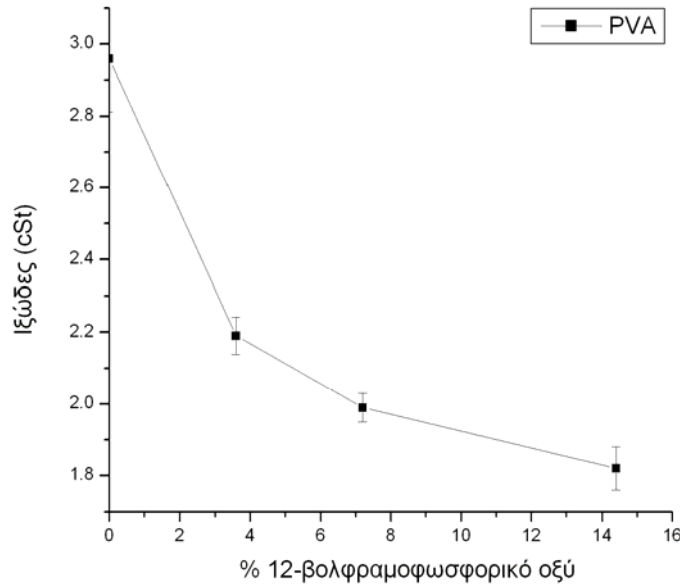
Από τις τιμές του Πίνακα 7 προκύπτει ότι τα διασταυρωμένα υμένια PVA παρουσιάζουν παρόμοιες γωνίες επαφής. Επομένως, δεν παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά στην υδροφιλικότητα της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης) με την προσθήκη επιπλέον ποσότητας PVA. Τελικά για την πραγματοποίηση πειραμάτων στα οποία θα μελετηθεί η αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών επιλέχθηκε το διάλυμα, από το οποίο προκύπτει το υμένιο που έχει την καλύτερη λιθογραφική συμπεριφορά και θα μπορούσε να αποτυπώσει τις μικρότερες δομές. Βάσει των λιθογραφικών αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το διάλυμα που περιέχει 4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM. Το υμένιο που προκύπτει από το διάλυμα 2% κ.β. PVA και 6.26% κ.β. POM δεν επιλέχθηκε γιατί στη βιβλιογραφία [232] αναφέρεται ότι το πάχος των υμενίων είναι σημαντικό για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών, καθώς, όσο το πάχος αυξάνεται τόσο περισσότεροι δότες/δέκτες που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου υπάρχουν στο υμένιο, με αποτέλεσμα το υμένιο να αλληλεπιδρά περισσότερο με το νερό [232]. Επομένως ένα υμένιο μεγαλύτερου πάχους είναι πιθανότερο να αλληλεπιδρά περισσότερο με τα μόρια νερού σε σχέση με ένα υμένιο μικρότερου πάχους γιατί έχει περισσότερους δότες/δέκτες υδρογόνων.

#### **2.2.2.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος στο ιξώδες του φωτοευαίσθητου διαλύματος πολυ(βινυλικής αλκοόλης)**

Για να ελεγχθεί αν η μεταβολή της συγκέντρωσης του φωτοευαίσθητοποιητή, 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ, επιδρά στο ιξώδες του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA παρασκευάστηκαν διαλύματα PVA τα οποία περιείχαν διάφορες περιεκτικότητες % κ.β. της POM και μετρήθηκε το ιξώδες (Σχήμα 127).

Από το Σχήμα 127 προκύπτει ότι όσο αυξάνει η περιεκτικότητα % κ.β. του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος τόσο μειώνεται το ιξώδες του φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA. Παρόλο που με την προσθήκη του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος αυξάνεται η περιεκτικότητα σε στερεά, εντούτοις παρατηρείται μείωση του ιξώδους, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος επηρεάζει την εξάπλωση των αλυσίδων της PVA μέσα στο διάλυμα, με αποτέλεσμα το ιξώδες αντί να αυξάνεται λόγω της παρουσίας περισσότερων στερεών να μειώνεται.

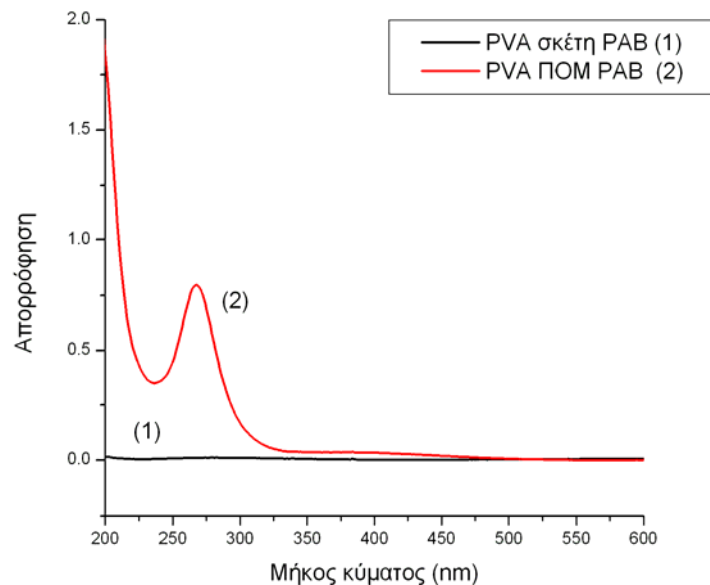




**Σχήμα 127.** Ιξώδες του διαλύματος PVA συναρτήσει της περιεκτικότητας % κ.β. σε 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ.

### 2.2.2.3. Απομάκρυνση του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος κατά τη διάρκεια της εμφάνισης

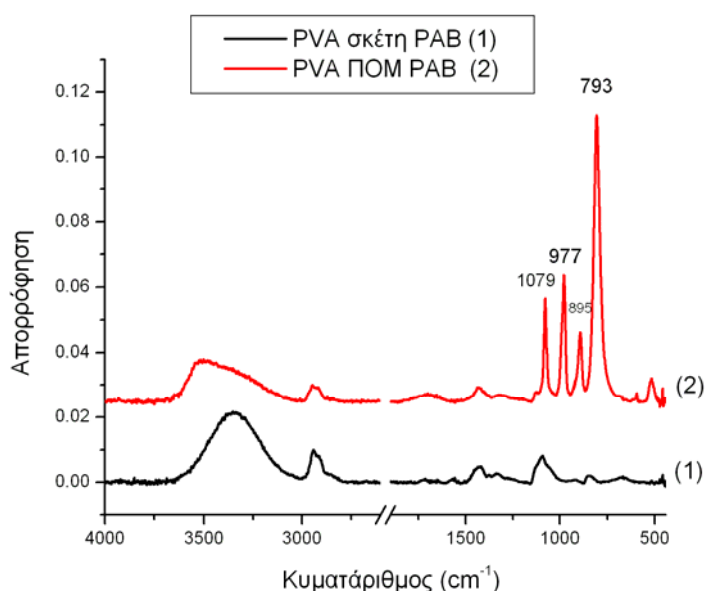
Προκειμένου να ελεγχθεί αν ο φωτοευαίσθητοποιητής 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ  $H_3PW_{12}O_{40}$  απομακρύνεται από το υμένιο κατά της διάρκεια της εμφάνισης, καταγράφηκαν τα φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό ενός υμενίου με σκέτη PVA και ενός υμενίου που παρασκευάστηκε από το διάλυμα PVA με το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (ΠΟΜ) που δίνει τα βέλτιστα λιθογραφικά αποτελέσματα, όπως προαναφέρθηκε, δηλαδή: 4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ. Τα υμένια επιστρώθηκαν στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση PAB στους 70 °C για 1min (Σχήμα 128).



**Σχήμα 128.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού για υμένιο σκέτης PVA (4.3% κ.β. PVA) μετά το PAB (1) και για υμένιο PVA που περιέχει ΠΟΜ (4.3% PVA και 14.4% ΠΟΜ) μετά το PAB (2).

Από το φάσμα (1) υπεριώδους-ορατού (Σχήμα 128) παρατηρείται ότι το υμένιο σκέτης PVA (4.3 % κ.β. PVA) που δεν περιέχει το φωτοευαίσθητοποιητή 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ δεν απορροφά στο υπεριώδες-ορατό, ενώ από το φάσμα (2) που αντιστοιχεί στο υμένιο που περιέχει 4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM (υμένιο PVA POM PAB) παρατηρείται ότι το υμένιο αυτό απορροφά μεταξύ 190 nm και 350 nm που είναι και η περιοχή έκθεσης του υμενίου. Η απορρόφηση αυτή οφείλεται στη μετάπτωση μεταφοράς φορτίου από το οξυγόνο στο μέταλλο ( $O \rightarrow W^{6+}$ ) μέσα στο ίδιο οκτάεδρο  $WO_6$  του πολυξοανιόντος  $PW_{12}O_{40}^{3-}$ . Επομένως, η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού είναι μία μέθοδος η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για να διαπιστωθεί αν η POM απομακρύνεται από το υμένιο της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης) μετά το στάδιο της εμφάνισης.

Για να ελεγχθεί περαιτέρω αν η POM απομακρύνεται από το υμένιο καταγράφηκαν και τα φάσματα υπέρυθρου του υμενίου σκέτης PVA (4.3 % κ.β. PVA) μετά από το PAB και του υμενίου που περιέχει 4.3% PVA και 14.4% POM μετά από το PAB (υμένιο PVA POM PAB) (Σχήμα 129).



**Σχήμα 129.** Φάσματα υπέρυθρου για υμένιο σκέτης PVA (4.3% κ.β. PVA) μετά το PAB (1) και για υμένιο PVA που περιέχει POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά το PAB (2).

Παρατηρείται ότι το φάσμα (2) που αντιστοιχεί στο υμένιο PVA που περιέχει POM (υμένιο PVA POM PAB) έχει κάποιες επιπλέον κορυφές σε σχέση με το φάσμα του υμενίου της σκέτης PVA. Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα παρατηρείται ότι, το φάσμα που αντιστοιχεί στην PVA που περιέχει την POM έχει επιπλέον κορυφές στα  $793\text{ cm}^{-1}$ ,  $895\text{ cm}^{-1}$ ,  $977\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1079\text{ cm}^{-1}$ . Οι επιπλέον αυτές κορυφές αποδίδονται στην παρουσία της POM [153]. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα  $793\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης της γέφυρας  $W-O_c-W$ , η κορυφή στα  $895\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης της γέφυρας  $W-O_b-W$ ,  $977\text{ cm}^{-1}$  και στα  $998\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης του δεσμού  $W-O_d$  και η κορυφή στα  $1079\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης του δεσμού  $P-O_a$ , όπου  $O_a$  είναι το οξυγόνο που ενώνεται με το κεντρικό άτομο του P που βρίσκεται στο κέντρο της δομής Keggin,  $O_b$  το οξυγόνο που ενώνει δύο γωνιακά οκτάεδρα,  $O_c$  είναι το οξυγόνο που ενώνει δύο τερματικά οκτάεδρα και  $O_d$  το τερματικό οξυγόνο (Σχήμα 43). Συνοπτικά, οι κορυφές που αντιστοιχούν στην POM

είναι στα  $793\text{ cm}^{-1}$  W-O<sub>c</sub>-W  $\nu_{\text{as}}$ ,  $895\text{ cm}^{-1}$  W-O<sub>b</sub>-W  $\nu_{\text{s}}$ ,  $977\text{ cm}^{-1}$  W-O<sub>d</sub>  $\nu_{\text{as}}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$  P-O<sub>a</sub>  $\nu_{\text{as}}$  όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8 [153].

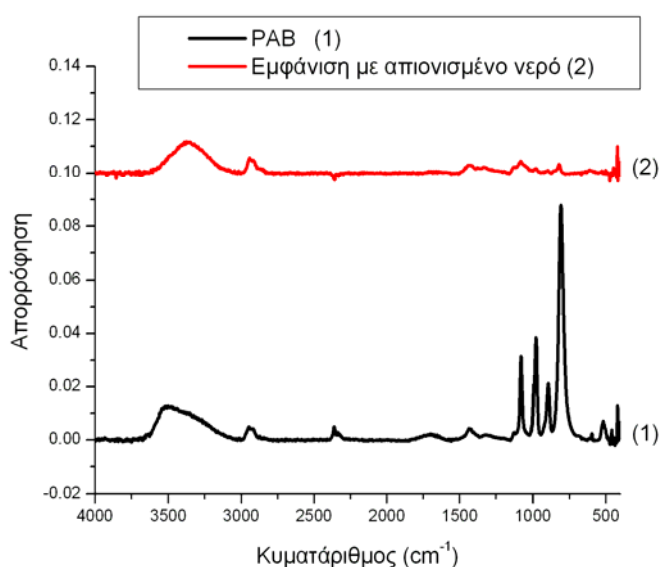
**Πίνακας 8.** Αντιστοιχία των κορυφών του φάσματος υπέρυθρου για το υμένιο PVA με ΠΟΜ (Σχήμα 129) με τις δονήσεις που πραγματοποιούνται στην πολυξομεταλλική ένωση H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>.

Κορυφή	Δόνηση
$793\text{ cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}$ W-O <sub>c</sub> -W
$895\text{ cm}^{-1}$	$\nu_{\text{s}}$ W-O <sub>b</sub> -W
$977\text{ cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}$ W-O <sub>d</sub>
$1079\text{ cm}^{-1}$	$\nu_{\text{as}}$ P-O <sub>a</sub>

Στο Σχήμα 129 παρατηρείται επίσης ότι η κορυφή στα  $3347\text{ cm}^{-1}$ , που αποδίδεται στις υδροξυλομάδες, -OH, του υμενίου της σκέτης PVA, έχει μετατοπιστεί στα  $3530\text{ cm}^{-1}$  στο υμένιο PVA με ΠΟΜ. Η μετατόπιση αυτή αποδίδεται στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των υδροξυλομάδων της PVA και της ΠΟΜ. Από την μελέτη αυτή συμπεραίνεται ότι, η φασματοσκοπία υπέρυθρου μπορεί να αξιοποιηθεί για την παρακολούθηση της απομάκρυνσης της ΠΟΜ κατά τη διάρκεια της εμφάνισης.

### 2.2.2.3.1. Εμφάνιση με απιονισμένο νερό

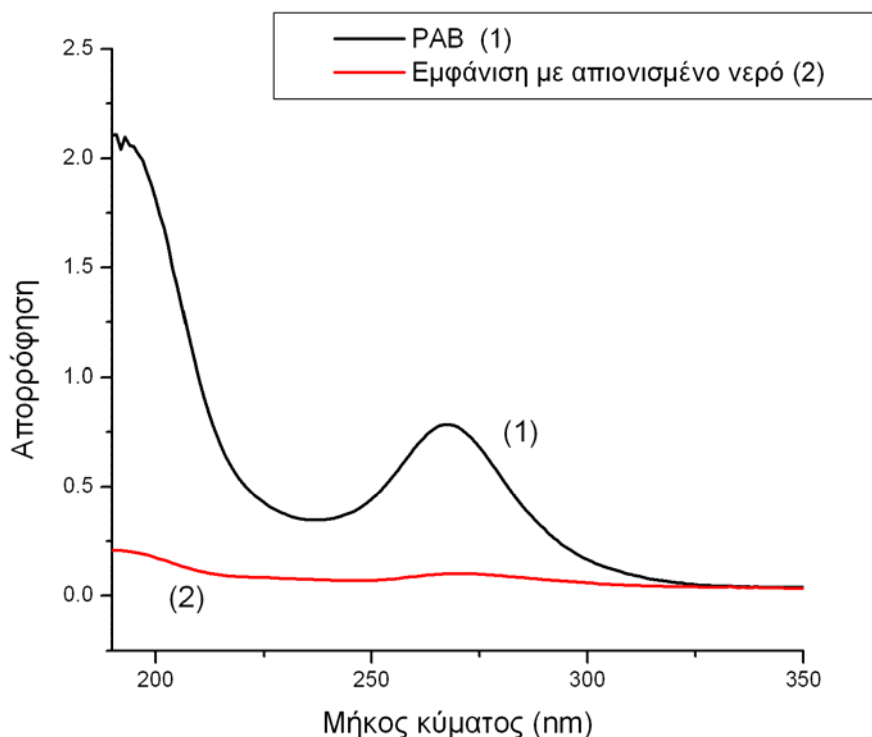
Για να ελεγχθεί αν ο φωτοευαισθητοποιητής 12-βολφραμοσφωφορικό οξύ, H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>, απομακρύνεται από τα διασταυρωμένα υμένια PVA μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό καταγράφηκαν τα φάσματα υπέρυθρου PVA με ΠΟΜ (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ) μετά την επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec και τη θέρμανση PAB στους 70 °C για 1 min και του διασταυρωμένου υμενίου (έκθεση στη λιθογραφική δόση και θέρμανση PEB στους 88 °C για 3 min μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό για 2 min (Σχήμα 130).



**Σχήμα 130.** Φάσματα υπέρυθρου του υμενίου PVA με ΠΟΜ (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (1) και του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με απιονισμένο νερό (2).

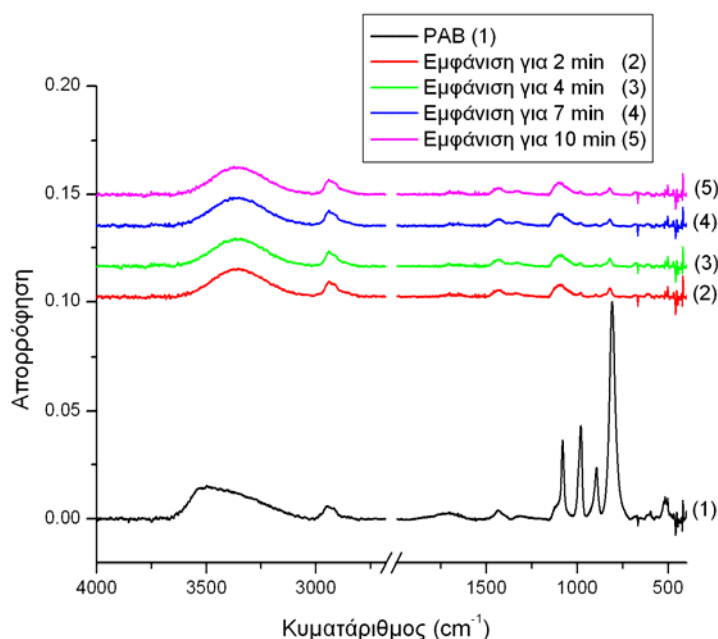
Παρατηρείται ότι στο διασταυρωμένο υμένιο που απομένει μετά την εμφάνιση οι κορυφές που αντιστοιχούν στην ΠΟΜ εμφανίζονται ελάχιστα στο φάσμα. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ΠΟΜ έχει απομακρυνθεί σε ένα μεγάλο ποσοστό μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό, αλλά όχι πλήρως. Επίσης, και εδώ παρατηρείται η μετατόπιση της κορυφής από τα  $3530\text{ cm}^{-1}$  (φάσμα 1) που υπάρχει στο υμένιο μετά το ΡΑΒ στα  $3360\text{ cm}^{-1}$  (φάσμα 2) που υπάρχει στο υμένιο μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό. Οι υδροξυλομάδες εμφανίζονται στα  $3530\text{ cm}^{-1}$  λόγω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στις υδροξυλομάδες της ΡVΑ και στην ΠΟΜ που υπάρχει στο αρχικό υμένιο. Στο τελικό υμένιο που προκύπτει μετά την εμφάνιση οι υδροξυλομάδες εμφανίζονται στα  $3360\text{ cm}^{-1}$  καθώς η ΠΟΜ έχει απομακρυνθεί σε μεγάλο ποσοστό.

Για τον ίδιο σκοπό καταγράφηκαν και τα φάσματα υπεριώδους-ορατού των ίδιων υμενίων (Σχήμα 131). Και από τα φάσματα υπεριώδους-ορατού (Σχήμα 131) παρατηρείται ότι, μετά την επίστρωση, την έκθεσή στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση ΡΕΒ και την εμφάνιση με απιονισμένο νερό η απορρόφηση του υμενίου είναι ελάχιστη, αλλά όχι μηδενική. Επομένως, επιβεβαιώθηκε ότι η ΠΟΜ έχει απομακρυνθεί από το υμένιο σε ένα μεγάλο ποσοστό, αλλά όχι πλήρως.



**Σχήμα 131.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού του υμενίου ΡVΑ με ΠΟΜ (4.3% κ.β. ΡVΑ και 14.4% κ.β. ΠΟΜ) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση ΡΑΒ (1) και του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση ΡΕΒ και την εμφάνιση με απιονισμένο νερό (2).

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση του χρόνου εμφάνισης στην απομάκρυνση της ΠΟΜ και μελετήθηκε αν τελικά θα επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση της ΠΟΜ στην περίπτωση που η εμφάνιση με απιονισμένο νερό πραγματοποιηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Σχήμα 132).

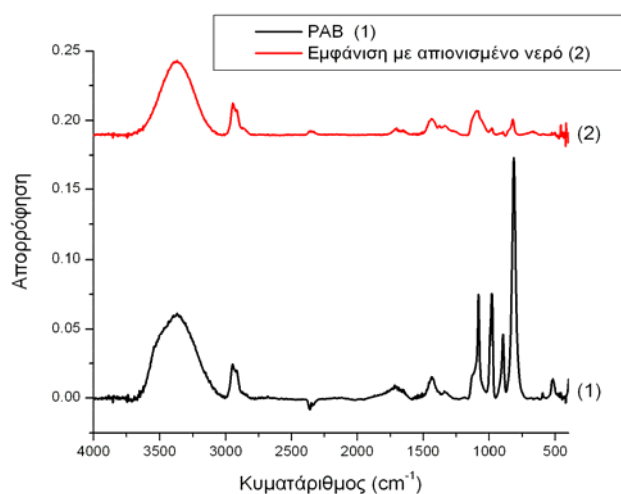


**Σχήμα 132.** Φάσματα υπερόυθρου του υμενίου PVA με ΠΟΜ (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (1) και των διασταυρωμένων υμενίων PVA μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση, για διαφορετικούς χρόνους εμφάνισης, με απιονισμένο νερό (φάσματα 2, 3, 4 και 5).

Από το Σχήμα 132 παρατηρείται ότι οι κορυφές στα  $793\text{ cm}^{-1}$ ,  $895\text{ cm}^{-1}$ ,  $977\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1079\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται σε ασύμμετρες δονήσεις τάσης της ΠΟΜ δεν εξαφανίζονται πλήρως μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό ακόμη και όταν η εμφάνιση διαρκεί 10 min.

Στα πειράματα που παρουσιάστηκαν στα Σχήματα 130, 131, 132 το αρχικό υμένιο είχε σύσταση 4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ (βλέπε Κεφάλαιο Γ.2.2.2.1.2).

Στη συνέχεια μελετήθηκε το υμένιο που περιείχε μικρότερο ποσοστό ΠΟΜ (8.2% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ). Το υμένιο αυτό μελετήθηκε στο Κεφάλαιο Γ.2.2.2.1.2. και αναμένεται η απομάκρυνση της ΠΟΜ να είναι πιο εύκολη σε αυτό. Η απομάκρυνση της ΠΟΜ μελετήθηκε μέσω φασματοσκοπίας υπερόυθρου (Σχήμα 133).



**Σχήμα 133.** Φάσματα υπερόυθρου του υμενίου PVA με ΠΟΜ (8.2% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (1) και του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με απιονισμένο νερό (2).

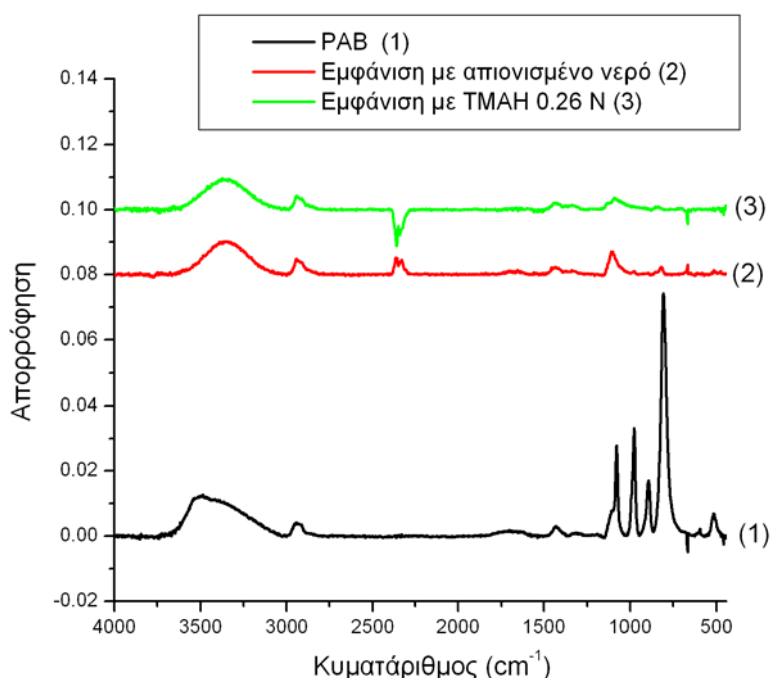
Και σε αυτά τα φάσματα (Σχήμα 133) παρατηρείται ότι στο υμένιο που απομένει μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό οι κορυφές που αντιστοιχούν στην POM εξακολουθούν να εμφανίζονται ελάχιστα στο φάσμα. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η POM δεν μπορεί να απομακρυνθεί πλήρως από το υμένιο όταν η εμφάνιση γίνεται με απιονισμένο νερό.

### 2.2.2.3.2. Εμφάνιση με υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου

Μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό που δεν είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη απομάκρυνση της POM από το διασταυρωμένο υμένιο PVA, έγινε προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί ως εμφανιστής το υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (Tetramethyl Ammonium Hydroxide, TMAH). Όπως έχει λεχθεί στο Κεφάλαιο Β.1.1 το πρότυπο υδατικό διάλυμα του TMAH έχει συγκέντρωση 0.26 N και είναι γνωστό με την εμπορική ονομασία AZ 726 MIF (διάλυμα AZ). Η επιλογή αυτή έγινε γιατί το TMAH είναι σχετικά ισχυρή βάση και γιατί είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα πολυοξοανιόντα υφίστανται αλκαλική υδρόλυση, σύμφωνα με την αντίδραση [151]:



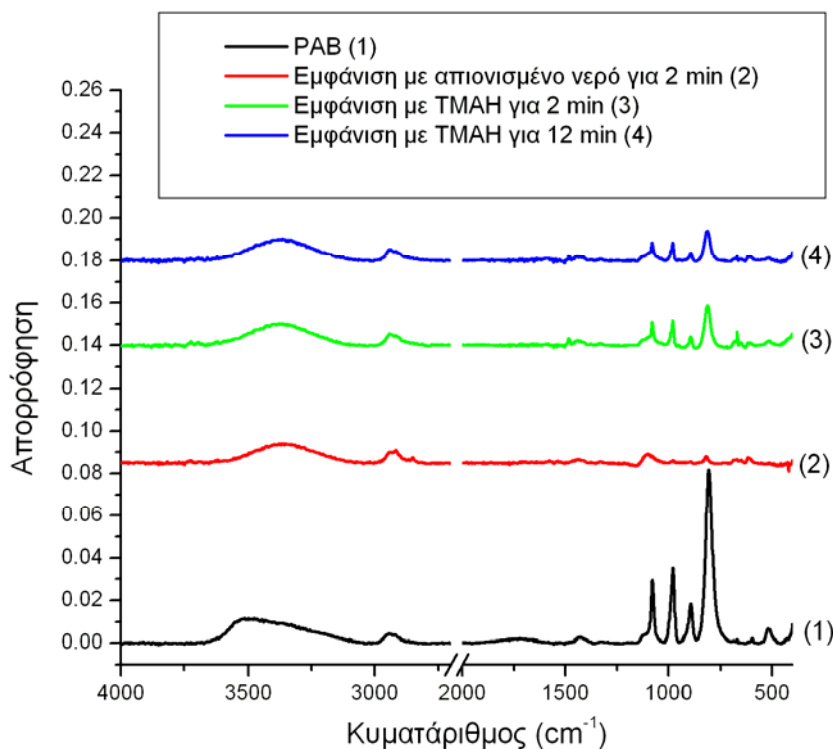
Για να ελεγχθεί αν η POM απομακρύνεται κατά την εμφάνιση καταγράφηκαν και συγκρίθηκαν τα φάσματα υπερώθρου ενός υμενίου PVA με POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec και τη θέρμανση PAB στους 70 °C για 1 min και των διασταυρωμένων υμενίων (έκθεση στη λιθογραφική δόση και θέρμανση PEB στους 88 °C για 3 min και η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε είτε σε απιονισμένο νερό για 2 min είτε σε TMAH για 2 min) (Σχήμα 134).



**Σχήμα 134.** Φάσματα υπερώθρου του υμενίου PVA με POM (4.3% PVA και 14.4% POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (1), του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με απιονισμένο νερό (2) και του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με TMAH 0.26 N (3).

Από τα φάσματα υπερύθρου που παρουσιάζονται στο Σχήμα 134 παρατηρείται η απουσία των κορυφών στα  $793\text{ cm}^{-1}$ ,  $895\text{ cm}^{-1}$  και στα  $977\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται στο 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (ΠΟΜ) στο υμένιο μετά την εμφάνιση με TMAH 0.26 N για 2 min. Η κορυφή στα  $1079\text{ cm}^{-1}$  δεν εξαφανίζεται πλήρως μετά την απομάκρυνση γιατί υπάρχει και στο υμένιο της σκέτης PVA (Σχήμα 129). Επομένως με χρήση του TMAH 0.26 N επιτυγχάνεται η πλήρης απομάκρυνση της ΠΟΜ.

Επειδή, όμως, το TMAH 0.26 N είναι αρκετά βασικό (pH=11) και υπολείμματα του εμφανιστή μπορούν, ενδεχομένως, να επηρεάσουν το βιολογικό υλικό που θα εναποτεθεί στις λιθογραφημένες επιφάνειες, επιλέχθηκαν κάποιες αραιώσεις του TMAH και μελετήθηκε αν η εμφάνιση σε αυτά τα διαλύματα θα είχε το ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή την πλήρη απομάκρυνση της ΠΟΜ. Για το σκοπό αυτό από το πρότυπο υδατικό διάλυμα TMAH συγκέντρωσης 0.26 N παρασκευάστηκε αραιωμένο διάλυμα 1:250 (η αραιώση πραγματοποιήθηκε με απιονισμένο νερό). Το αραιωμένο διάλυμα TMAH 1:250 χρησιμοποιήθηκε στην εμφάνιση των διασταυρωμένων υμενίων PVA για δύο διαφορετικούς χρόνους 2 min και 12 min. Ο έλεγχος της απομάκρυνσης της ΠΟΜ έγινε με την καταγραφή των φασμάτων υπερύθρου (Σχήμα 135).



**Σχήμα 135.** Φάσματα υπερύθρου του υμενίου PVA με ΠΟΜ (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (1), του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με απιονισμένο νερό για 2 min (2) και του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με διάλυμα TMAH 0.26 N με αραιώση 1:250 για 2 min (3) και του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με TMAH 0.26 N με αραιώση 1:250 για 12 min (4).

Από τα φάσματα υπερύθρου (Σχήμα 135) διαπιστώνεται ότι η ΠΟΜ δεν απομακρύνεται πλήρως με τη χρήση του αραιωμένου 1:250 διαλύματος TMAH 0.26 N, ακόμα και για μεγάλους χρόνους εμφάνισης (12 min). Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από τις μετρήσεις πάχους των διασταυρωμένων υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) μετά από εμφάνιση σε απιονισμένο νερό και σε

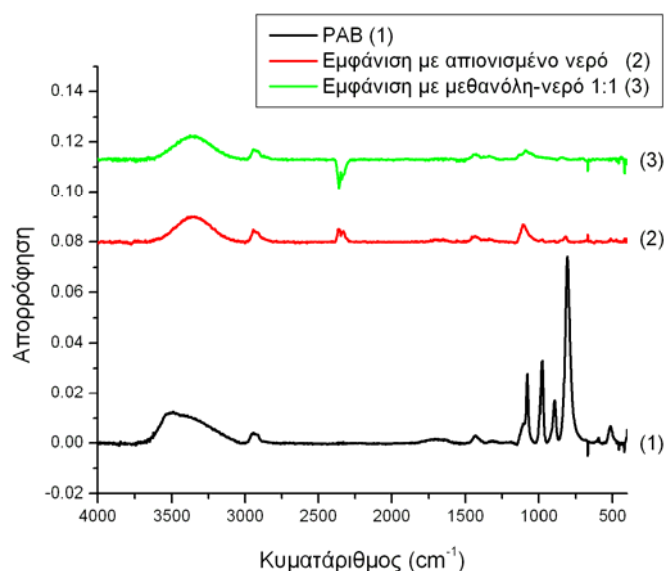
αραιωμένο 1:250 διάλυμα TMAH 0.26 N για 12 min, καθώς παρατηρείται ότι το τελευταίο έχει μεγαλύτερο πάχος από αυτό που εμφανίστηκε σε απιονισμένο νερό, υποδεικνύοντας ότι έχει εναπομείνει κάποια ποσότητα POM μέσα στο τελικό διασταυρωμένο υμένιο (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.** Πάχη του αρχικού υμενίου PVA με POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) και των διασταυρωμένων υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) μετά από την εμφάνιση για 2 min σε απιονισμένο νερό και μετά από την εμφάνιση για 12 min σε αραιωμένο 1:250 διάλυμα TMAH 0.26 N.

Διεργασία	Πάχος (nm)
PAB	120.5
Εμφάνιση με απιονισμένο νερό για 2 min	60
Εμφάνιση με TMAH 1:250 για 12min	87

### 2.2.2.3.3. Εμφάνιση με μεθανόλη-νερό

Στη συνέχεια, για την εμφάνιση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεθανόλης-νερού με αναλογία 1:1 v/v, το οποίο δεν επηρεάζει σημαντικά τα βιομόρια. Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης ελήφθησαν τα φάσματα υπέρυθρου ενός υμενίου PVA με POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec και τη θέρμανση PAB στους 70 °C για 1 min (Σχήμα 136 φάσμα 1) και των διασταυρωμένων υμενίων, τα οποία επιστρώθηκαν όπως το υμένιο PVA με POM και μετά το PAB ακολούθησε έκθεση στη λιθογραφική δόση και θέρμανση PEB στους 88 °C για 3 min και η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε είτε με απιονισμένο νερό για 2 min (Σχήμα 136 φάσμα 2) είτε με διάλυμα μεθανόλης απιονισμένου νερού 1:1 v/v για 2 min (Σχήμα 136 φάσμα 3).



**Σχήμα 136.** Φάσματα υπέρυθρου του υμενίου PVA με POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (1) του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με απιονισμένο νερό (2) και του διασταυρωμένου υμενίου μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-απιονισμένου νερού 1:1 (3).



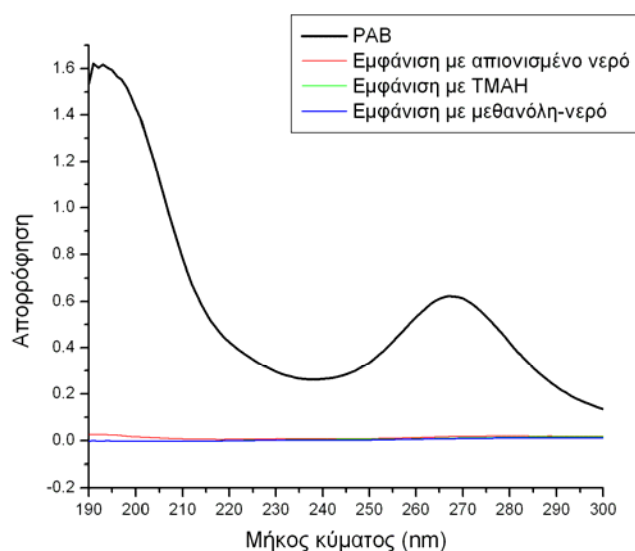
Από το πείραμα αυτό (Σχήμα 136) διαπιστώνεται ότι με χρήση του διαλύματος μεθανόλης-νερού 1:1 v/v κατά το στάδιο της εμφάνισης επιτυγχάνεται η πλήρης απομάκρυνση της POM, καθώς στο αντίστοιχο φάσμα (Σχήμα 136 φάσμα 3) παρατηρείται η απουσία των κορυφών στα  $793\text{ cm}^{-1}$ ,  $895\text{ cm}^{-1}$  και στα  $977\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται στο 12-βολφραμοφοσφορικό οξύ (POM).

#### 2.2.2.3.4. Συνολικά όλοι οι εμφανιστές

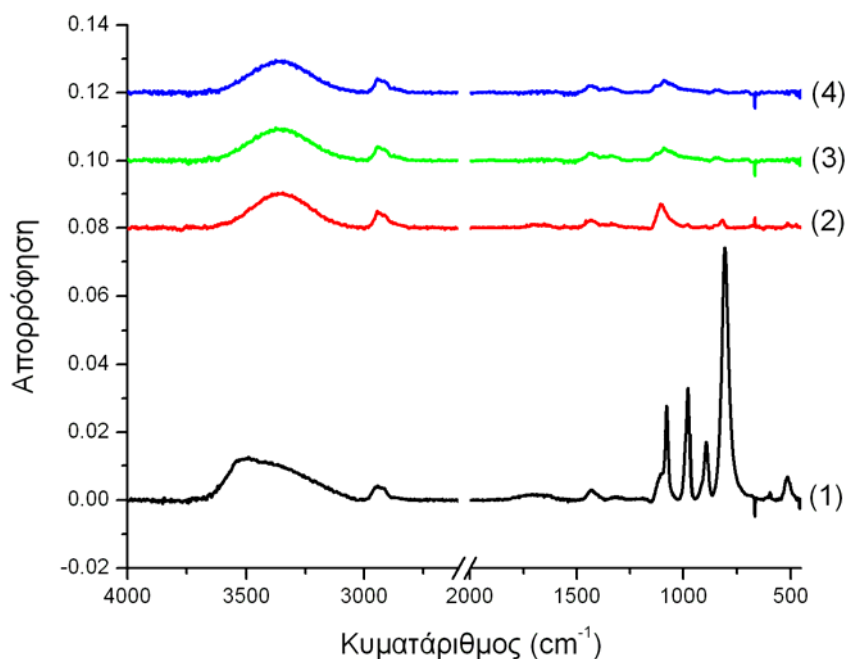
Στο Σχήμα 137 παρατίθενται συγκριτικά τα φάσματα υπεριώδους-ορατού και στο Σχήμα 138 παρατίθενται τα φάσματα υπέρυθρου (του αρχικού υμενίου PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB στους  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 1 min και των διασταυρωμένων υμενίων μετά την επίστρωση, τη θέρμανση PAB, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση στους διάφορους εμφανιστές που χρησιμοποιήθηκαν) προκειμένου να επιλεγεί το διάλυμα στο οποίο θα πραγματοποιείται η εμφάνιση στα επόμενα πειράματα. Για τον ίδιο λόγο παρατίθεται και ο συγκεντρωτικός πίνακας με τα πάχη των υμενίων (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Πάχη του αρχικού υμενίου (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB και των διασταυρωμένων υμενίων μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση στους διάφορους εμφανιστές που χρησιμοποιήθηκαν.

Υμένιο	Πάχος υμενίου (nm)
PAB	120.5
Εμφάνιση με απιονισμένο νερό για 2 min	60
Εμφάνιση με 1:250 TMAH 0.26 N για 2 min	57
Εμφάνιση με μεθανόλη:νερό 1:1 v/v για 2 min	56



**Σχήμα 137.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού του αρχικού υμενίου PVA με POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (μαύρη γραμμή) και των διασταυρωμένων υμενίων μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με: απιονισμένο νερό (κόκκινη γραμμή), διάλυμα TMAH 0.26 N (πράσινη γραμμή) και με διάλυμα μεθανόλης-νερού (μπλέ γραμμή).



**Σχήμα 138.** Φάσματα υπέρυθρου του αρχικού υμενίου PVA με POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση PAB (1) και των διασταυρωμένων υμενίων μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση PEB και την εμφάνιση με: απιονισμένο νερό (2), διάλυμα TMAH 0.26 N (3) και με διάλυμα μεθανόλης-νερού (4).

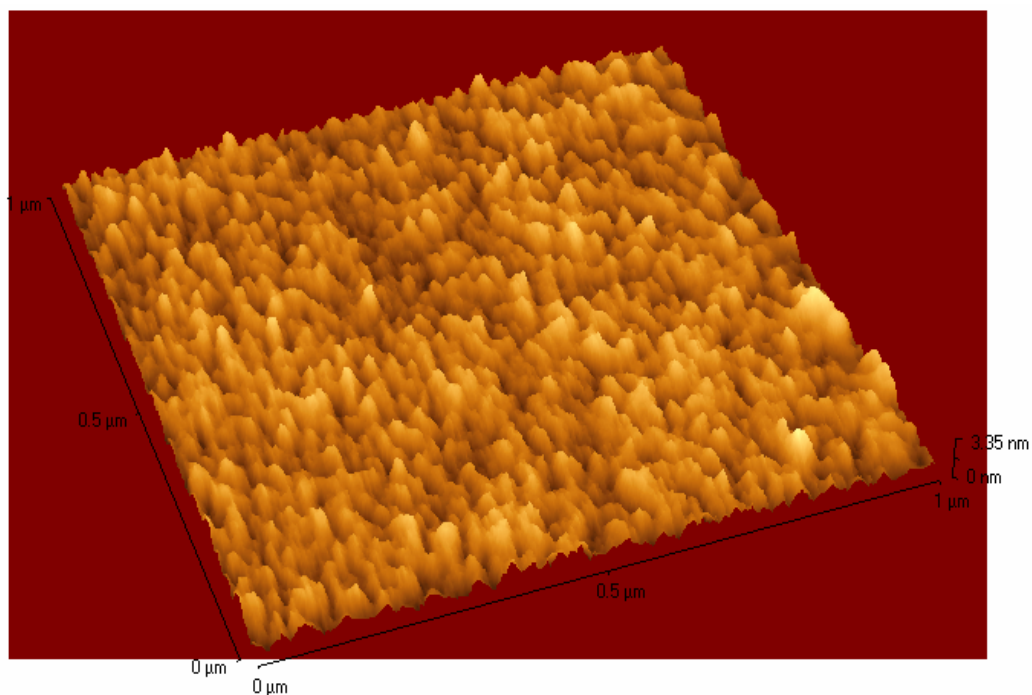
Από τα Σχήματα 137 και 138 διαπιστώνεται ότι η πλήρης απομάκρυνση της POM από το διασταυρωμένο υμένιο PVA επιτυγχάνεται με χρήση του διαλύματος TMAH συγκέντρωσης 0.26 N και του διαλύματος μεθανόλης-νερού 1:1 v/v, καθώς στα αντίστοιχα φάσματα παρατηρείται η απουσία των κορυφών που αντιστοιχούν στην POM. Επίσης, μετρώντας τα πάχη των τελικών υμενίων (Πίνακας 10) διαπιστώνεται ότι τα πάχη των τελικών υμενίων που έχουν εμφανιστεί με διάλυμα TMAH 0.26 N και με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v είναι μικρότερα σε σύγκριση με το πάχος του τελικού υμενίου μετά την εμφάνιση με απιονισμένο νερό. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει το προηγούμενο συμπέρασμα.

Τελικά, επιλέχθηκε η εμφάνιση των διασταυρωμένων υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) να γίνεται με το διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v γιατί πιθανά υπολείμματα μεθανόλης στην πολυμερική μήτρα δεν επηρεάζουν σημαντικά το βιολογικό υλικό που θα ακινητοποιηθεί στις επιφάνειες, οι οποίες θα έχουν σχηματιστεί μέσω της λιθογραφικής διεργασίας της PVA.

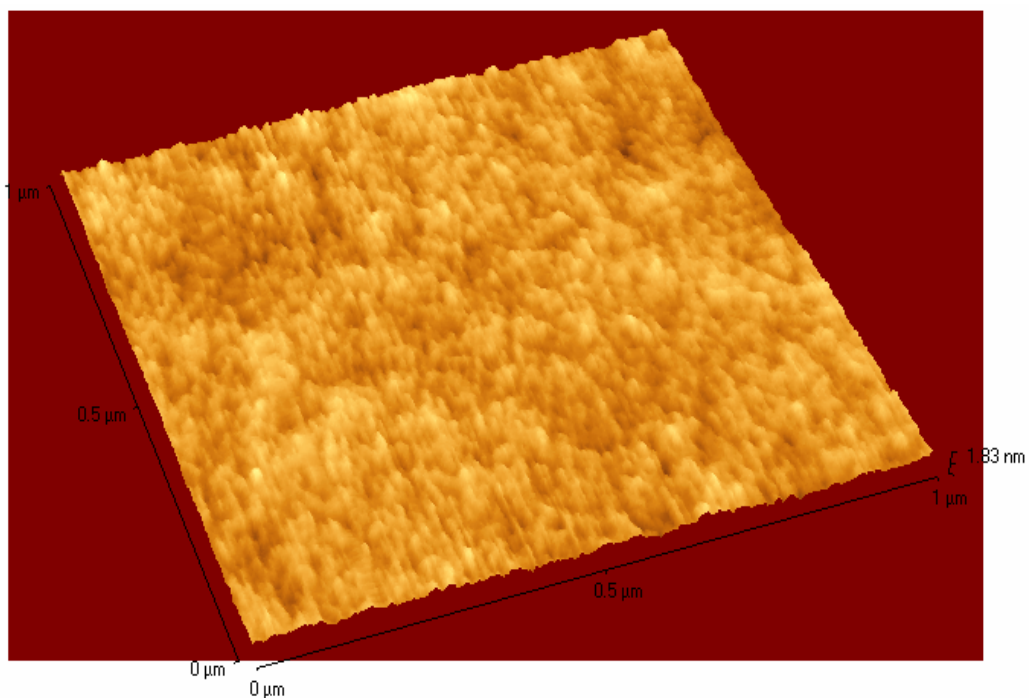
#### 2.2.2.4. Τραχύτητα των υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης)

Η επιφάνεια των υμενίων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) μελετήθηκε μέσω εικόνων που ελήφθησαν με το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscope, AFM). Συγκεκριμένα ελήφθησαν εικόνες ενός υμενίου σκέτης PVA (4.3% κ.β. PVA) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) (Σχήμα 139), ενός υμενίου PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) (Σχήμα 140) και ενός διασταυρωμένου υμενίου PVA μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB), την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση στους 88 °C για 3 min

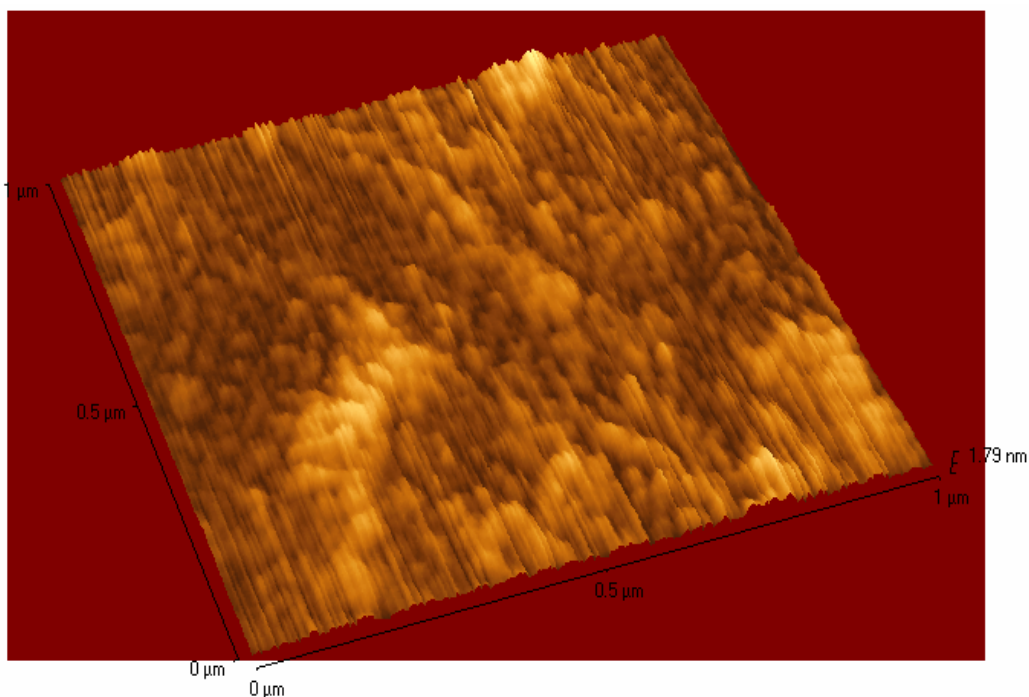
(PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min (Σχήμα 141). Οι επιστρώσεις έγιναν σε επιφάνεια πυριτίου. Οι διαστάσεις των σαρώσεων είναι 1 $\mu$ m\*1 $\mu$ m. Οι εικόνες AFM ελήφθησαν από την Δρ. Ε. Μακαρώνα.



**Σχήμα 139.** Τρισδιάστατη απεικόνιση της επιφάνειας ενός υμενίου σκέτης PVA (4.3% κ.β. PVA) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση (PAB) που ελήφθη με το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (AFM).



**Σχήμα 140.** Τρισδιάστατη απεικόνιση της επιφάνειας ενός υμενίου PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση (PAB) που ελήφθη με το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (AFM).



**Σχήμα 141.** Τρισδιάστατη απεικόνιση της επιφάνειας ενός διασταυρωμένου υμενίου PVA μετά την επίστρωση, τη θέρμανση (PAB), την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v που ελήφθη με το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (AFM).

Στη συνέχεια στον Πίνακα 11 δίνονται τα χαρακτηριστικά αυτών των επιφανειών όπως προσδιορίστηκαν από την επεξεργασία των εικόνων AFM.

**Πίνακας 11.** Χαρακτηριστικά των επιφανειών των διαφόρων υμενίων PVA, τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση των εικόνων που ελήφθησαν με το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (AFM)

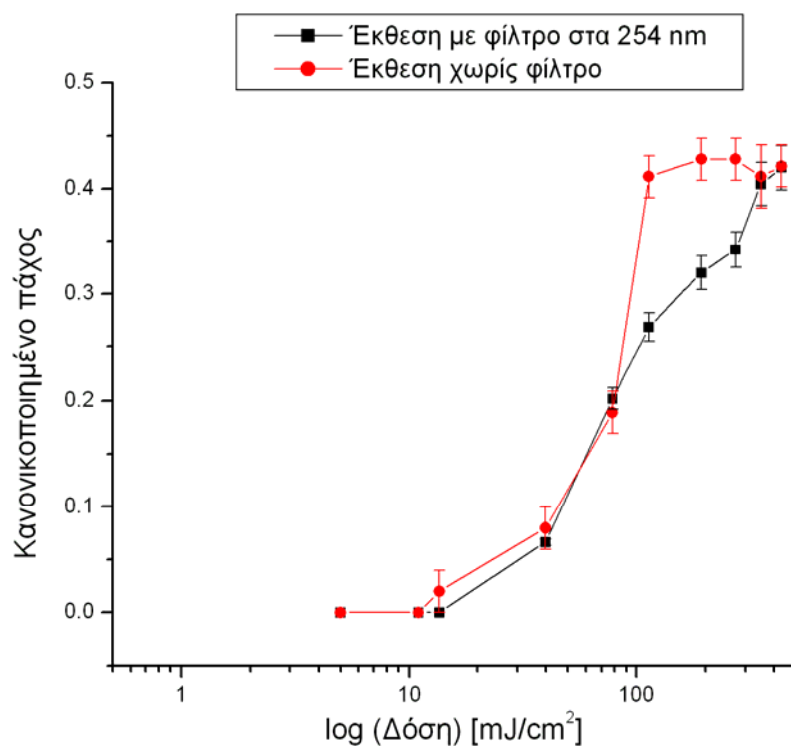
Υμένιο	τραχύτητα rms (nm)	Μέσο ύψος δομών (nm)
PVA σκέτη (4.3% κ.β. PVA)	0.47	1.85
PVA ΠΟΜ (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. ΠΟΜ) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση (PAB)	0.23	Μη καθορισμένο
PVA διασταυρωμένη μετά την επίστρωση, τη θέρμανση (PAB), την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1	0.30	0.37

Ουσιαστικά, παρατηρείται από τις εικόνες που ελήφθησαν με το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων ότι το υμένιο της σκέτης PVA (Σχήμα 139) παρουσιάζει μία ομοιόμορφη τραχύτητα, η οποία οφείλεται στις αλυσίδες της PVA. Όταν σε αυτό το υμένιο εισάγεται η ΠΟΜ (12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) τότε το υμένιο είναι πολύ ομοιογενές και έχει πολύ μικρή τραχύτητα (Σχήμα 140). Τέλος το υμένιο της διασταυρωμένης PVA που παρασκευάζεται μετά από επίστρωση, τη θέρμανση (PAB), την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v (Σχήμα 141) παρουσιάζει λίγο μεγαλύτερη

τραχύτητα σε σύγκριση με το αρχικό. Η τραχύτητα αυτή, πιθανώς, οφείλεται στη διασταύρωση της PVA και στην απομάκρυνση της POM από την πολυμερική μήτρα.

### 2.2.2.5. Βελτιστοποίηση του σταδίου της έκθεσης

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το διασταυρωμένο υμένιο PVA σε πειράματα με διαλύματα πρωτεϊνών, μετά τη βελτιστοποίηση του σταδίου της εμφάνισης, μελετήθηκε το στάδιο της έκθεσης. Για να βελτιστοποιηθεί το στάδιο της έκθεσης προσδιορίστηκαν οι καμπύλες αντίθεσης. Οι συνθήκες για την κατασκευή των καμπύλων αντίθεσης ήταν: Επίστρωση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) σε δίσκιο πυριτίου στις 4000 rpm για 30 sec και θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Στη συνέχεια το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV χωρίς φίλτρο ή μέσω φίλτρου στα 254 nm σε διάφορες δόσεις προκειμένου να προσδιοριστεί η λιθογραφική δόση. Ακολούθως, έγινε θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min.



**Σχήμα 142.** Καμπύλες αντίθεσης διαλύματος που περιέχει 4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM όταν η έκθεση γίνεται με φίλτρο στα 254 nm και χωρίς φίλτρο.

Παρατηρείται από το Σχήμα 142 ότι, κατά την έκθεση με φίλτρο στα 254 nm το πάχος του υμενίου αυξάνεται σταδιακά, ενώ κατά την έκθεση χωρίς φίλτρο, το πάχος του υμενίου αυξάνεται απότομα. Επίσης, παρατηρείται ότι η δόση που απαιτείται για να διασταυρωθεί πλήρως το υμένιο και για να σχηματιστεί το τελικό πάχος είναι πιο μεγάλη στην περίπτωση της έκθεσης με φίλτρο στα 254 nm. Η έκθεση τελικά επιλέχθηκε να πραγματοποιείται με φίλτρο στα 254 nm προκειμένου να καθορίζεται το τελικό πάχος του υμενίου ελεγχόμενα με τη δόση έκθεσης.

### 2.2.2.6. Προκαταρκτική μελέτη της αποτροπής της προσρόφησης πρωτεϊνών σε υμένα διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης)

Για να ελεγχθεί η αποτροπή της προσρόφησης πρωτεϊνών στο υμένιο διασταυρωμένης PVA πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαλύματα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός, καθώς όπως προαναφέρθηκε η οροαλβουμίνη χρησιμοποιείται σε μελέτες φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών λόγω της ύπαρξής της στο αίμα [222].

Για την εναπόθεση των πρωτεϊνών οι λιθογραφημένες επιφάνειες εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικά διαλύματα, καθώς οι πρωτεΐνες διαλύονται σε ρυθμιστικά διαλύματα για να εναποτεθούν στις επιφάνειες. Γι' αυτό μελετήθηκε η επίδραση των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών ιόντων και ανθρακικών ιόντων στο πάχος των υμενίων της διασταυρωμένης PVA (Πίνακας 12). Παρασκευάστηκαν τέσσερα δείγματα: 1) Υμένιο του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA παρουσία της POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) επιστρωμένο σε δισκίο πυριτίου στις 4000 rpm για 30 sec στο οποίο πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. 2) Υμένιο διασταυρωμένης PVA που παρασκευάστηκε όπως το υμένιο 1 και πραγματοποιήθηκε επιπλέον έκθεση στη λιθογραφική δόση, θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 10 min. 3) Υμένιο διασταυρωμένης PVA που παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 2 και ακολούθησε εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05 M pH 7.4 για 1 h. 4) Υμένιο διασταυρωμένης PVA που παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 2 και ακολούθησε εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05 M pH 9.2 για 1 h.

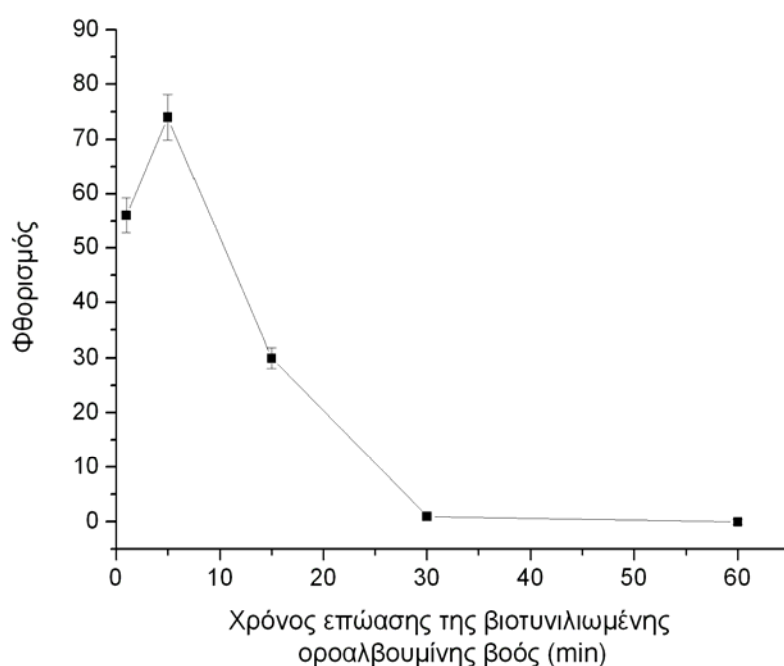
**Πίνακας 12.** Πάχη του αρχικού υμενίου PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. POM) μετά την επίστρωση και τη θέρμανση (PAB) και των διασταυρωμένων υμενίων PVA μετά την επίστρωση, την έκθεση στη λιθογραφική δόση, τη θέρμανση (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v και μετά την εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ανθρακικών ιόντων.

Δείγμα	Πάχος υμενίου (nm)
Αρχικό (μετά το PAB)	157
Εμφάνιση με μεθανόλη νερό 1:1 για 10 min	72
Εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων για 1h	74
Εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων για 1h	60

Η διαφορά του πάχους ανάμεσα στο αρχικό και στο διασταυρωμένο υμένιο PVA οφείλεται στην απομάκρυνση της POM κατά το στάδιο της εμφάνισης. Παρατηρείται ότι δεν επηρεάζεται το πάχος του υμενίου της διασταυρωμένης PVA από την εμβάπτιση για 1 h σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων, ενώ παρατηρείται μια μικρή μείωση του πάχους όταν το υμένιο εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων για 1h.

Στη συνέχεια οι φωτο-λιθογραφημένες επιφάνειες της PVA εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Συγκεκριμένα η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05 M pH 7.4 και σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων 0.05 M pH 9.2, έτσι ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 2.5 μg/mL και 25 μg/mL. Στα διαλύματα αυτά εμβαπτίστηκαν για 1 h οι φωτο-λιθογραφημένες επιφάνειες της διασταυρωμένης PVA. Ακολούθως, τα υμένα εμβαπτίστηκαν για 1 h σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός, διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05 M, pH 7.4) σε τελική

συγκέντρωση 10 g/L. Τέλος, οι επιφάνειες εμβαπτίστηκαν για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 συγκέντρωσης 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05 M, pH 7.4, που περιείχε 10 g/L οροαλβουμίνη βοός, ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05 M, pH 7.4 και με απιονισμένο νερό, στεγνώθηκαν σε ρεύμα  $\text{N}_2$  και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Παρατηρείται ότι, η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός προσδένεται στις περιοχές που ξεπλύθηκαν και όχι στις περιοχές που εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Επομένως, συμπεραίνεται ότι ο χρόνος που έρχεται σε επαφή η επιφάνεια με το διάλυμα της πρωτεΐνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσρόφησης της. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να διερευνηθεί η επίδραση του χρόνου επώασης στην προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στη διασταυρωμένη PVA.



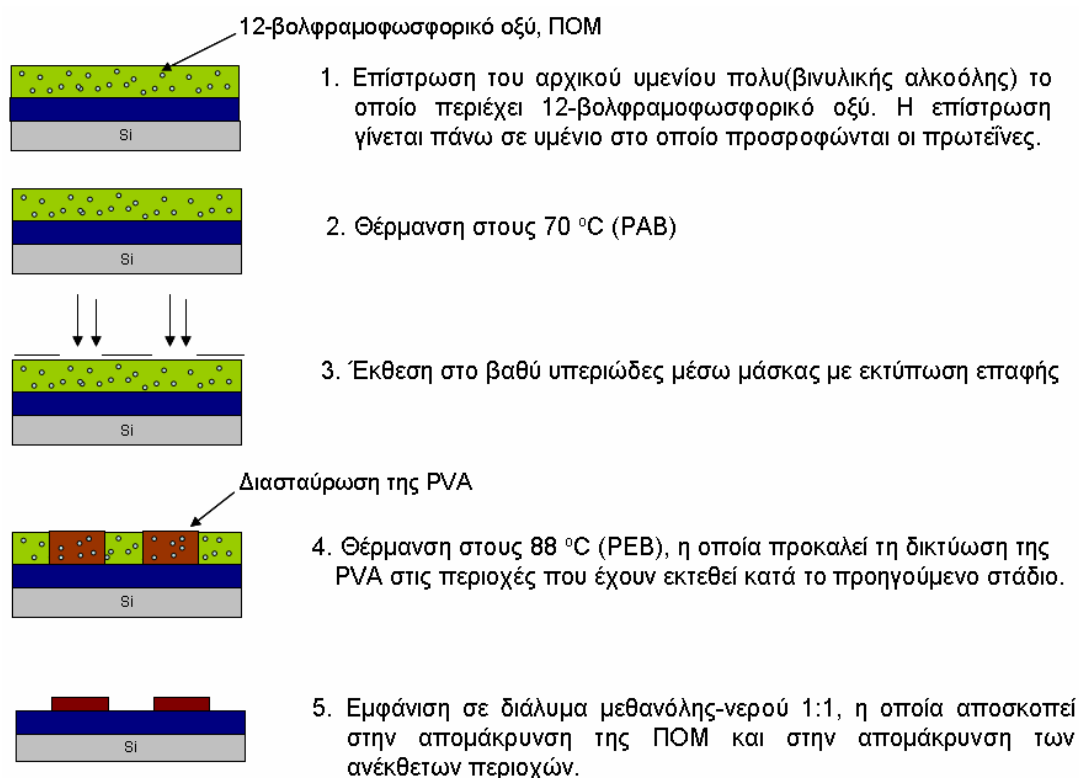
**Σχήμα 143.** Επίδραση του χρόνου επώασης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05 M pH 7.4 στην ικανότητα προσρόφησης της διασταυρωμένης PVA.

Υμένια διασταυρωμένης PVA, τα οποία είχαν σχηματοποιηθεί με φωτολιθογραφία πάνω σε δισκία πυριτίου εμβαπτίστηκαν σε βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05 M pH 7.4 σε τελική συγκέντρωση 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για διάφορους χρόνους επώασης 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h. Ακολούθως, τα υμένια εμβαπτίστηκαν για 1 h σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός, διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05 M, pH 7.4) σε τελική συγκέντρωση 10 g/L. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα στρεπταβιδίνης επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 συγκέντρωσης 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05 M, pH 7.4, που περιείχε 10 g/L οροαλβουμίνη βοός, για 30 min. Εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05 M, pH 7.4 και με απιονισμένο νερό και στεγνώθηκαν σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Τέλος καταγράφηκε η πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός μέσω της αντίδρασης με την φθορισμοεπισημασμένη στρεπταβιδίνη μέσω μετρήσεων με μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήμα 143).

Από το Σχήμα 143 παρατηρείται ότι, η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός με την αύξηση του χρόνου επώασης προσδενόταν όλο και λιγότερο στο υμένιο της διασταυρωμένης PVA, δηλαδή μετά από τα 30 min εμβάπτισης των υμενίων στο διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός η πρόσδεση ήταν μηδενική.

### 2.2.2.7. Προτεινόμενη λιθογραφική διεργασία για τη σχηματοποίηση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) με σκοπό την εφαρμογή της σε βιοαναλυτικές διεργασίες

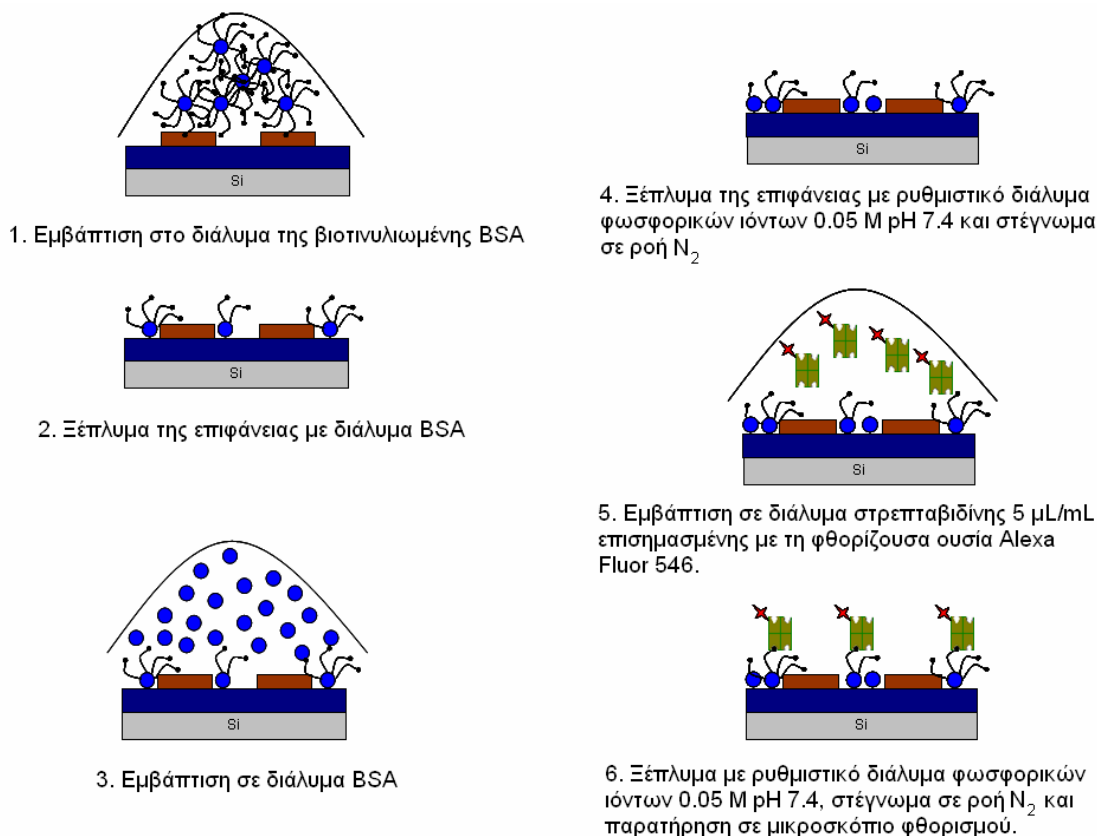
Μετά από τα επιτυχή προκαταρκτικά πειράματα που αφορούσαν την αποτροπή της προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε φωτολιθογραφημένες επιφάνειες PVA, προτείνεται μέθοδος για την επιλεκτική προσρόφηση πρωτεϊνών μέσω της διασταυρωμένης PVA. Η προτεινόμενη φωτολιθογραφική διεργασία για τη σχηματοποίηση πρωτεϊνών παρουσιάζεται στο Σχήμα 144. Η PVA φωτο-λιθογραφείται πάνω σε υπόστρωμα, στο οποίο οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται μέσω φυσικής προσρόφησης, προκειμένου να επιτευχθεί η επιλεκτική προσρόφηση πρωτεϊνών και παράλληλα να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της διασταυρωμένης PVA ως προς την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης των πρωτεϊνών.



**Σχήμα 144.** Προτεινόμενη λιθογραφική διεργασία για τη σχηματοποίηση της PVA πάνω σε υμένιο, στο οποίο προσροφώνται οι πρωτεΐνες.

Η διεργασία για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών παρομοιάζει με τη διεργασία για την ακινητοποίηση της βιοτίνης πάνω στη λιθογραφημένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR (Κεφάλαιο Γ.1.2.1). Στην προκειμένη περίπτωση δεν ακινητοποιείται η βιοτίνη ή κάποιο παράγωγό της αλλά μελετάται η φυσική προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 145).





**Σχήμα 145.** Στάδια για την επιλεκτική προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οραλβουμίνης βοός στις αποκεκαλυμμένες περιοχές από το υποκείμενο υπόστρωμα και παράλληλη αποτροπή της φυσικής προσρόφησης στις δομές της διασταυρωμένης PVA.

### 2.2.3. Μελέτη υποστρωμάτων για τη φυσική προσρόφηση πρωτεϊνών

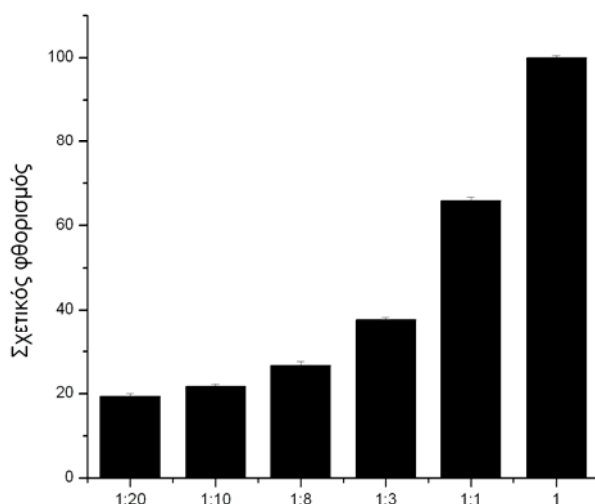
Προκειμένου να επιτευχθεί η επιλεκτική προσρόφηση πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός υποκείμενου υποστρώματος, το οποίο θα δεχτεί τη φωτολιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA και επιπλέον σε αυτό θα ακινητοποιούνται οι πρωτεΐνες μέσω φυσικής προσρόφησης. Οι επιθυμητές ιδιότητες του υποκείμενου υποστρώματος είναι: να ευνοείται σε αυτό η φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών, να μην διαλύεται σε υδατικά διαλύματα και να μην επηρεάζεται από τη φωτολιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA.

Επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως πιθανά υποστρώματα υλικά γνωστά από τη βιβλιογραφία, στα οποία έχει μελετηθεί η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οραλβουμίνης βοός [233]. Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα από τα πιθανά υποκείμενα υποστρώματα που μελετήθηκαν.

#### 2.2.3.1. Υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης (AZ5214)

Αρχικά μελετήθηκε ένα φωτοευαίσθητο υλικό που παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο A.2.2.3.1.1, το οποίο αποτελείται από νεολάκα και διαζωναφθοκινόνη και είναι γνωστό με την εμπορική ονομασία AZ5214. Επειδή η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται μέσω φθορισμού και επειδή η AZ5214 φθορίζει μελετήθηκαν υμένια AZ5214 διαφορετικού πάχους με σκοπό τον προσδιορισμό του κατάλληλου πάχους έτσι ώστε ο αυτο-φθορισμός του υλικού να μην είναι έντονος και να μην επηρεάζει τις μετρήσεις. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα AZ5214 σε Μεθυλοισοβουτυλο-κετόνη (Methyl Isobutyl Ketone, MIBK) διαφορετικών αραιώσεων, τα

οποία επιστρώθηκαν σε δισκία πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη. Αναλυτικότερα στο δισκίο πυριτίου επιστρώθηκε η εξαμεθυλοδισιλαζάνη στις 7000 rpm για 30 sec και μετά ακολούθησε η επίστρωση των διαλυμάτων της AZ5214 στις 3000 rpm για 30 sec. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 200 °C για 1 h. Τέλος μετρήθηκε ο αυτο-φθορισμός των υμενίων μέσω μικροσκοπίου φθορισμού (Σχήμα 146) και τα πάχη τους (Πίνακας 13). Το υμένιο που προκύπτει από μη αραιωμένο AZ5214 έχει πάχος 1552 nm.



**Σχήμα 146.** Αυτο-φθορισμός υμενίων AZ5214 για διαφορετικές αραιώσεις με MIBK. Η τελευταία στήλη αντιστοιχεί σε υμένιο που έχει προκύψει από το αρχικό διάλυμα της AZ5214, δηλαδή το μη αραιωμένο διάλυμα. Ο αυτο-φθορισμός του υμενίου που προκύπτει από το μη αραιωμένο διάλυμα της AZ5214 τέθηκε ίσος με 100%.

**Πίνακας 13.** Πάχη υμενίων AZ5214 για διαφορετικές αραιώσεις με MIBK.

Αραίωση AZ5214 σε MIBK (AZ5214:MIBK)	Πάχος (nm)
1:20AZ5214	26
1:10 AZ5214	54
1:8 AZ5214	69
1:3 AZ5214	182
1:1 AZ5214	494

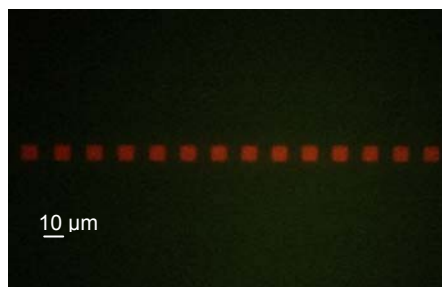
Το υμένιο AZ5214 που προέκυψε από την επίστρωση του διαλύματος AZ5214 με αραιώση 1:20 σε MIBK έχει πάχος 26nm. Το υμένιο αυτό είναι πολύ δύσκολο να λιθογραφηθεί και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε το υμένιο που προέκυψε από την αραιώση 1:10, το οποίο έχει πάχος 54 nm και παρουσιάζει παρεμφερή φθορισμό σε σχέση με το υμένιο AZ5214 πάχους 26 nm.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λιθογραφία αρνητικού τόνου της AZ5214. Το δισκίο πυριτίου σε αυτό το πείραμα δεν τροποποιήθηκε με εξαμεθυλοδισιλαζάνη για να μην επηρεαστεί η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός, που θα

πραγματοποιηθεί στο επόμενο στάδιο αμέσως μετά τη φωτολιθογραφία. Οι συνθήκες της λιθογραφίας δίνονται παρακάτω:

1. Επίστρωση του διαλύματος 1:10 AZ5214:MIBK στις 3000 rpm για 30 sec.
2. Θέρμανση (PAB) στους 110 °C για 1.5 min.
3. Έκθεση για 30 sec μέσω μάσκας. Η έκθεση πραγματοποιήθηκε στον ευθυγραμμιστή μασκών MA6 από την Δρ. Μ. Χατζηχρηστίδη που είναι πιστοποιημένος χρήστης του οργάνου.
4. Θέρμανση (PEB) στους 120 °C για 1.5 min.
5. Έκθεση όλου του υμενίου για 3 min στα 365 nm.
6. Εμφάνιση με υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (TMAH) για 1 min.
7. Θέρμανση στους 125 °C για 30 min για να σταθεροποιηθεί το υμένιο.

Στη συνέχεια οι λιθογραφημένες επιφάνειες της AZ5214 εμβαπτίστηκαν για 1 h σε διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 μg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Κατόπιν, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Ακολούθως, εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 2.5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Στη συνέχεια, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05M και pH 7.4, το οποίο περιέχει 0.05% v/v Tween-20. Τέλος, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Τα υμένια που προκύπτουν μελετώνται μέσω των φωτογραφιών που λαμβάνονται με το Μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήμα 147).



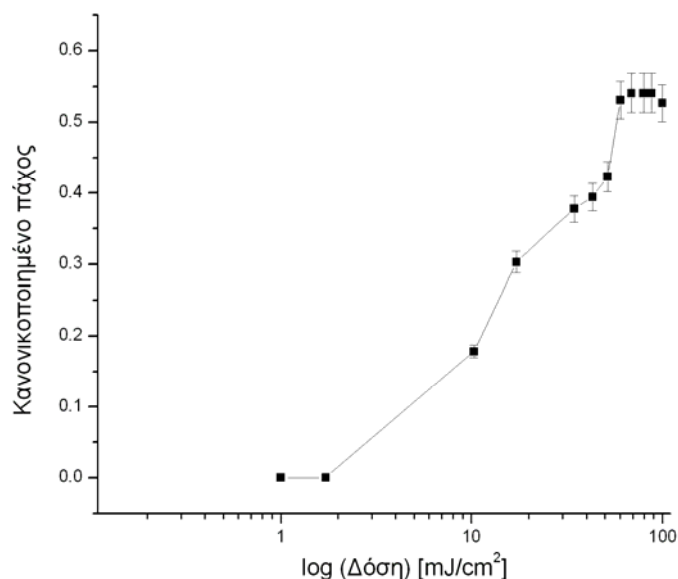
**Σχήμα 147.** Τετράγωνα μεγέθους 10 μm που προέκυψαν από τη λιθογραφία αρνητικού τόνου υμενίου AZ5214 (AZ5214 αραιωμένη 1:10 σε MIBK). Στις δομές της AZ5214 ακινητοποιήθηκε βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός, η οποία ανιχνεύθηκε μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Φωτογραφία από μικροσκόπιο φθορισμού.

Διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα πρόσδεσης των λιθογραφημένων υμενίων της AZ5214 ήταν ικανοποιητική μετά από 1h εμβάπτισης στο διάλυμα της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 147). Επομένως το υμένιο της AZ5214 που προκύπτει από την αραιώση 1:10 σε MIBK επιλέχθηκε σαν υποκείμενο υπόστρωμα για την υλοποίηση της προτεινόμενης διεργασίας (Σχήμα 144).

#### 2.2.3.1.1. Φωτολιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) πάνω σε υμένιο νεολάκας/διαζωναφθοκινόνης

Αρχικά προσδιορίστηκε η λιθογραφική δόση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. ΠΟΜ), στην οποία είναι απαραίτητο να εκτεθεί

προκειμένου να επιτευχθεί η σχηματοποίηση της PVA πάνω από το υμένιο AZ5214. Η λιθογραφική δόση προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλης αντίθεσης (Σχήμα 148).



**Σχήμα 148.** Καμπύλη αντίθεσης του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), το οποίο είχε επιστρωθεί πάνω σε υμένιο AZ5214.

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αντίθεσης (Σχήμα 148) το δισκίο πυριτίου τροποποιήθηκε με εξαμεθυλοδισιλαζάνη, η οποία επιστρώθηκε στις 7000 rpm για 30 sec. Ακολούθησε η επίστρωση του διαλύματος της AZ5214 αραιωμένου 1:10 (AZ5214:MIBK) σε MIBK στις 3000 rpm για 30 sec. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε θέρμανση στους 200 °C για 1 h. Έπειτα, επιστρώθηκε το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Κατόπιν, το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω φίλτρου στα 254 nm σε διάφορες δόσεις, προκειμένου να προσδιοριστεί η λιθογραφική δόση. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min. Από την καμπύλη αντίθεσης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 148 βρέθηκε ότι η λιθογραφική δόση είναι 51.6 mJ/cm<sup>2</sup>.

Στο επόμενο στάδιο ήταν απαραίτητο να μελετηθεί η επίδραση της λιθογραφικής διεργασίας της PVA στο υποκείμενο υμένιο AZ5214, γιατί όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο Γ.2.2.3 το υπόστρωμα είναι επιθυμητό να μην επηρεάζεται από τη φωτο-λιθογραφική διεργασία της PVA. Γι' αυτό το λόγο μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής του αρχικού υμενίου AZ5214 και του υμενίου AZ5214 που είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία της PVA (Πίνακας 14). Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν δύο δείγματα: 1) Υμένιο AZ5214, το οποίο επιστρώθηκε (συνθήκες επίστρωσης 3000 rpm για 30 sec) σε δισκίο πυριτίου, που είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (συνθήκες επίστρωσης 7000 rpm για 30 sec), και ακολούθησε θέρμανση στους 200 °C για 1 h. 2) Υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB), εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min).

**Πίνακας 14.** Γωνίες επαφής των υμενίων AZ5214: 1) Υμένιο AZ5214 2) Υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM).

Υμένια	Γωνίες επαφής
Υμένιο AZ5214	84°
Υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA	49°

Από τη μέτρηση των γωνιών επαφής, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 14, παρατηρείται ότι η γωνία επαφής του υμενίου AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA μεταβάλλεται αρκετά σε σχέση με τη γωνία επαφής του αρχικού υμενίου AZ5214. Επομένως, η λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA επηρεάζει το υποκείμενο υμένιο AZ5214. Αυτό ήταν μία πολύ σημαντική παρατήρηση και γι' αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε.

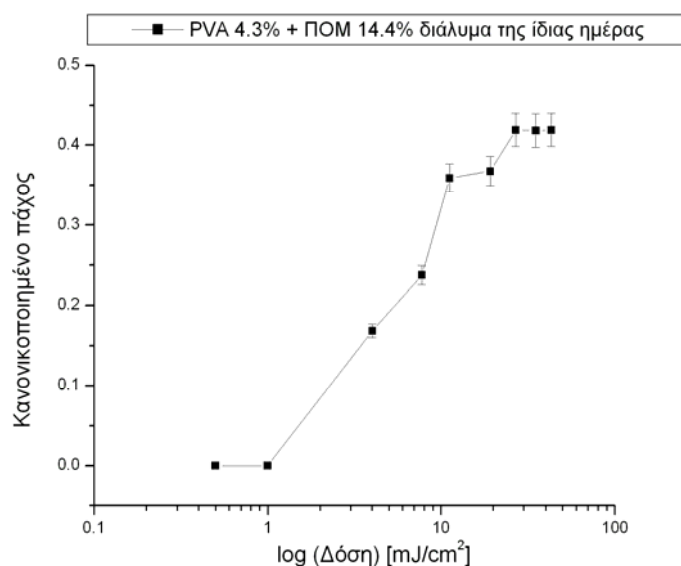
Από τις επαναληπτικές μετρήσεις των γωνιών επαφής παρατηρήθηκε ότι οι γωνίες επαφής του υμενίου AZ5214 που έχει υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) επηρεάζονται από το χρόνο γήρανσης των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM). Η επίδραση του χρόνου γήρανσης των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της PVA, τα οποία περιέχουν την POM που όπως έχει προαναφερθεί είναι το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ, μελετήθηκε διεξοδικά και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στο επόμενο Κεφάλαιο.

#### **2.2.3.1.2. Επίδραση του χρόνου γήρανσης των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) στις ιδιότητες των υποκείμενων υποστρωμάτων AZ5214**

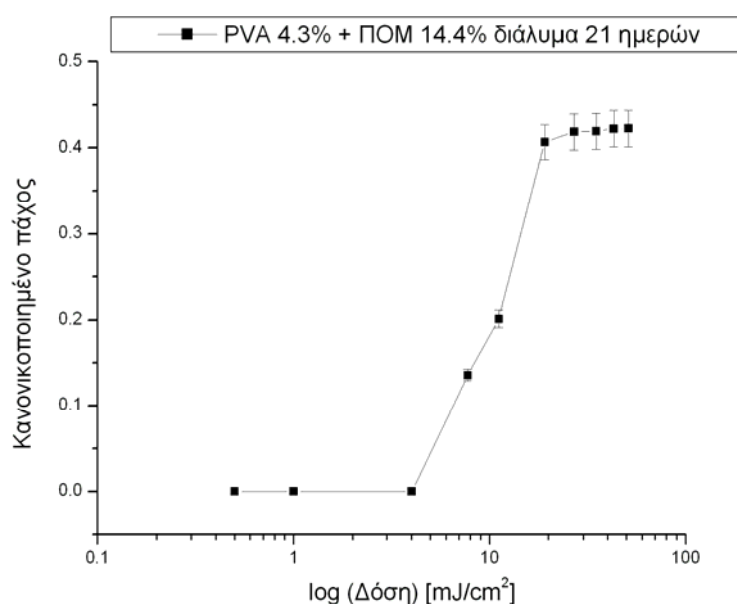
Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος γήρανσης του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) επηρεάζει όχι μόνο τις γωνίες επαφής αλλά και την ικανότητα προσρόφησης των υποκείμενων υποστρωμάτων AZ5214, γι' αυτό πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων για να επιβεβαιωθούν αυτές οι παρατηρήσεις.

Αρχικά συγκρίθηκαν οι καμπύλες αντίθεσης (Σχήμα 149 και Σχήμα 150) για φωτοευαίσθητα διαλύματα PVA, στα οποία η ποσότητα του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος προστέθηκε σε διαφορετικές ημέρες. Συγκεκριμένα στο πρώτο διάλυμα η ποσότητα του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος προστέθηκε την ίδια ημέρα με την μέρα που έγιναν οι μετρήσεις των γωνιών επαφής και κατασκευάστηκε η καμπύλη αντίθεσης (διάλυμα της ίδιας ημέρας) (Σχήμα 149) και στο δεύτερο διάλυμα η ποσότητα του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος είχε προστεθεί 21 ημέρες πριν τις μετρήσεις των γωνιών επαφής και πριν την κατασκευή της καμπύλης αντίθεσης (διάλυμα 21 ημερών) (Σχήμα 150). Οι συνθήκες για την κατασκευή των καμπυλών αντίθεσης ήταν επίστρωση της εξαμεθυλοδισιλαζάνης στις 7000 rpm για 30 sec σε δισκίο πυριτίου. Έπειτα, επίστρωση του αραιωμένου 1:10 (AZ5214:MIBK) διαλύματος της AZ5214 σε MIBK στις 3000 rpm για 30 sec και θέρμανση στους 200 °C για 1 h. Κατόπιν, επιστρώθηκε το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% PVA, 14.4% POM) στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Στη συνέχεια, το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω φίλτρου στα 254 nm σε διάφορες δόσεις προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αντίθεσης. Ακολούθως έγινε θέρμανση (PEB) στους 88

°C για 3 min και πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min.



**Σχήμα 149.** Καμπύλη αντίθεσης φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) το οποίο παρασκευάστηκε την ίδια ημέρα που λιθογραφήθηκε πάνω στο υμένιο της AZ5214 (διάλυμα της ίδιας ημέρας).



**Σχήμα 150.** Καμπύλη αντίθεσης φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) το οποίο παρασκευάστηκε 21 ημέρες πριν λιθογραφηθεί στο υμένιο της AZ5214 (διάλυμα 21 ημερών).

Επίσης μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής: 1) Υμενίου AZ5214 που είχε επιστρωθεί πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με εξαμεθυλοδισιλαζάνη, 2) Υμενίου AZ5214 που είχε υποστεί τη λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης και 3) Διασταυρωμένου υμενίου PVA πάνω σε υμένιο AZ5214 μετά την λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) με την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης στη λιθογραφική δόση, η οποία προσδιορίστηκε από τις καμπύλες αντίθεσης. Στον Πίνακα 15 παρατίθενται οι γωνίες επαφής που αφορούν το διάλυμα της ίδιας ημέρας και στον Πίνακα 16

παρατίθενται οι γωνίες επαφής που αφορούν το διάλυμα 21 ημερών. Οι μετρήσεις των γωνιών επαφής και οι καμπύλες αντίθεσης έχουν επιβεβαιωθεί από επαναλήψιμα πειράματα.

**Πίνακας 15.** Γωνίες επαφής των υμενίων: 1) AZ5214 2) AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) που είχε παρασκευαστεί την ίδια ημέρα (διάλυμα της ίδιας ημέρας) πριν λιθογραφηθεί στο υμένιο της AZ5214 3) Διασταυρωμένο υμένιο PVA μετά τη λιθογραφική διεργασία φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) που είχε παρασκευαστεί την ίδια ημέρα (διάλυμα της ίδιας ημέρας) πριν διασταυρωθεί πάνω σε υμένιο AZ5214.

Υμένια	Γωνίες επαφής
AZ5214 αρχικό	70°
AZ5214 λιθογραφική διεργασία φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (διάλυμα της ίδιας ημέρας)	34°
PVA διασταυρωμένη (διάλυμα της ίδιας ημέρας)	69°

**Πίνακας 16.** Γωνίες επαφής των υμενίων: 1) AZ5214 2) AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA (4.3% PVA, 14.4% POM) που είχε παρασκευαστεί 21 ημέρες (διάλυμα 21 ημερών) πριν λιθογραφηθεί στο υμένιο της AZ5214 3) Διασταυρωμένο υμένιο PVA μετά τη λιθογραφική διεργασία φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA (4.3% PVA, 14.4% POM) που είχε παρασκευαστεί 21 ημέρες (διάλυμα 21 ημερών) πριν διασταυρωθεί πάνω σε υμένιο AZ5214.

Υμένια	Γωνίες επαφής
AZ5214 αρχικό	70°
AZ5214 λιθογραφική διεργασία φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (διάλυμα 21 ημερών)	53°
PVA διασταυρωμένη (διάλυμα 21 ημερών)	67°

Από τις καμπύλες αντίθεσης (Σχήματα 149 και 150) παρατηρείται ότι η ευαισθησία των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της PVA είναι διαφορετική. Αναλυτικότερα, συμπεραίνεται ότι η ευαισθησία του διαλύματος της ίδιας ημέρας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το διάλυμα 21 ημερών, το οποίο χρειάζεται μεγαλύτερη δόση για να αρχίσει να σχηματίζεται υμένιο διασταυρωμένης PVA. Επίσης το τελικό πάχος των υμενίων διασταυρωμένης PVA που παρασκευάζονται από τα δύο διαλύματα είναι το 43% του αρχικού πάχους, δηλαδή η απώλεια του πάχους που οφείλεται στην απομάκρυνση της POM είναι ίδια.

Από τις μετρήσεις των γωνιών επαφής (Πίνακες 15 και 16) παρατηρείται ότι η γωνία επαφής του υμενίου της AZ5214 αλλάζει μετά την επίστρωση, τη θέρμανση (PAB και PEB) και την εμφάνιση του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM). Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι τα υμένια της AZ5214 στα οποία έχει λιθογραφηθεί (χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) έχουν μικρότερη γωνία επαφής σε σχέση με το αρχικό υμένιο. Αυτό αποδίδεται στη φυσική προσρόφηση αλυσίδων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) στο υποκείμενο υμένιο AZ5214.

Επίσης παρατηρείται ότι το υμένιο της AZ5214 το οποίο έχει δεχθεί την επίστρωση, θέρμανση (PAB και PEB) και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της

PVA που έχει προκύψει από διάλυμα (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) της ίδιας ημέρας είναι πιο υδρόφιλο σε σχέση με αυτό που δέχθηκε την επίστρωση, θέρμανση (PAB και PEB) και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που έχει προκύψει από διάλυμα (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) 21 ημερών. Αυτό αποδίδεται στη φυσική προσρόφηση περισσότερων αλυσίδων PVA στο υμένιο της AZ5214 που επιστρώνεται το διάλυμα της ίδιας ημέρας. Από το αποτέλεσμα αυτό συμπεραίνεται ότι οι αλληλεπιδράσεις της PVA με το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ είναι έντονες, όπως είχε διαπιστωθεί και από το ιξώδες των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της PVA, το οποίο μεταβαλλόταν συναρτήσει της περιεκτικότητας των διαλυμάτων σε 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (Σχήμα 127). Εικάζεται ότι οι αλυσίδες της PVA στα διαλύματα με το πέρας του χρόνου σχηματίζουν συσσωματώματα μέσα στο φωτοευαίσθητο διάλυμα της που περιέχει την POM, ενώ αρχικά είναι μεμονωμένες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το διάλυμα της ίδιας ημέρας να επηρεάζει περισσότερο τις ιδιότητες της υποκείμενης επιφάνειας σε σχέση με το διάλυμα 21 ημερών. Επομένως, η φυσική προσρόφηση αλυσίδων PVA είναι πιο έντονη στο υμένιο της AZ5214 που δέχεται την επίστρωση του διαλύματος της ίδιας ημέρας γιατί οι αλυσίδες της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) είναι διάσπαρτες μέσα στο διάλυμα με αποτέλεσμα να προσροφώνται περισσότερο, ενώ στο διάλυμα 21 ημερών οι αλυσίδες της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) έχουν σχηματίσει συσσωματώματα, με αποτέλεσμα να προσροφώνται λιγότερο στο υπόστρωμα και τελικά να απομακρύνονται περισσότερο κατά τη διάρκεια της εμφάνισης και του ξεπλύματος με απιονισμένο νερό που έπεται του σταδίου της εμφάνισης.

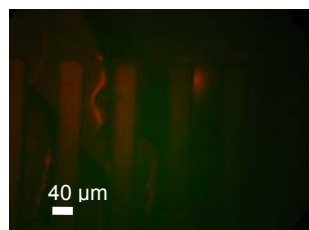
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της γήρανσης των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων PVA στην ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών των υποκείμενων υμενίων AZ5214.

Για αυτή τη μελέτη παρασκευάστηκαν δείγματα από τρία διαφορετικά φωτοευαίσθητα διαλύματα PVA. Συγκεκριμένα στο πρώτο διάλυμα η ποσότητα του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (POM) προστέθηκε την ίδια ημέρα με την μέρα που έγιναν οι λιθογραφίες και η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (διάλυμα της ίδιας ημέρας) (Σχήμα 151), στο δεύτερο διάλυμα η ποσότητα του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος είχε προστεθεί 10 ημέρες πριν τις λιθογραφίες και την προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (διάλυμα 10 ημερών) (Σχήμα 152) και στο τρίτο διάλυμα η ποσότητα του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος είχε προστεθεί 45 ημέρες πριν τις λιθογραφίες και την προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (διάλυμα 45 ημερών) (Σχήμα 153). Οι συνθήκες για τις λιθογραφίες ήταν: Επίστρωση της εξαμεθυλοδισιλαζάνης στις 7000 rpm για 30 sec σε δισκίο πυριτίου. Επίστρωση του αραιωμένου 1:10 (AZ5214:MIBK) διαλύματος της AZ5214 σε MIBK στις 3000 rpm για 30 sec και θέρμανση στους 200 °C για 1 h. Επίστρωση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Έκθεση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA σε ακτινοβολία UV μέσω μάσκας λιθογραφίας και μέσω φίλτρου στα 254 nm στη λιθογραφική δόση προκειμένου να κατασκευαστούν οι σχηματοποιημένες επιφάνειες PVA πάνω στο υμένιο AZ5214. Θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min.

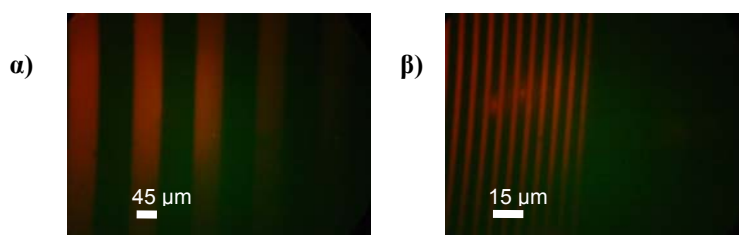
Ακολούθως οι λιθογραφημένες επιφάνειες εμβαπτίζονται για 1 h σε διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 µg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Έπειτα, οι επιφάνειες ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10



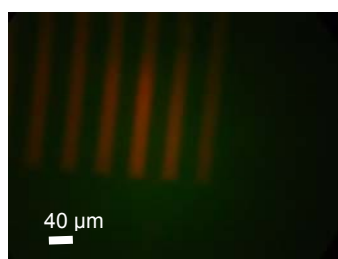
g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Στη συνέχεια, εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οραλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και τέλος ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Τα υμένια που προκύπτουν μελετώνται μέσω των φωτογραφιών που λαμβάνονται με το Μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήματα 151, 152 και 153).



**Σχήμα 151.** Λιθογραφία φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που έχει προκύψει από διάλυμα (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) της ίδιας ημέρας πάνω σε υμένιο AZ5214 και πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οραλβουμίνης βοός. Η βιοτινυλιωμένη οραλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού. Γραμμές πλάτους 40 μm.



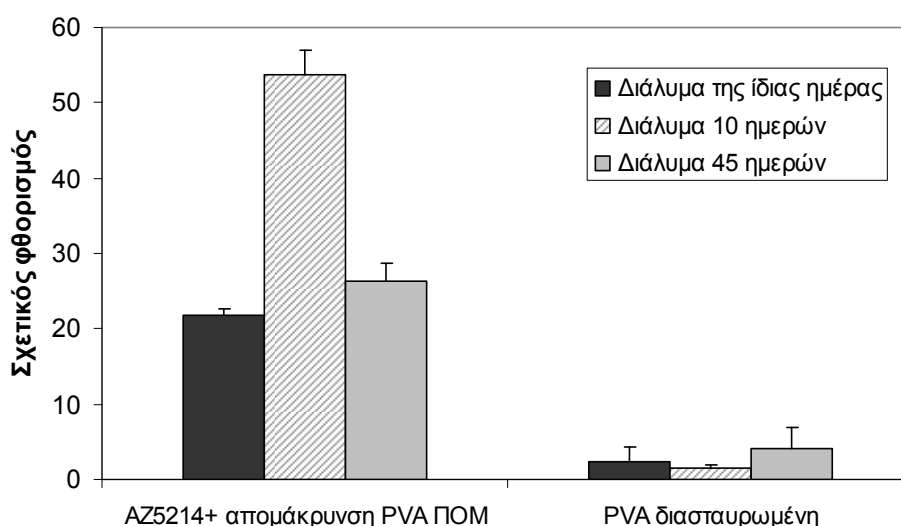
**Σχήμα 152.** Λιθογραφία φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που έχει προκύψει από διάλυμα (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) 10 ημερών πάνω σε υμένιο AZ5214 και πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οραλβουμίνης βοός. Η βιοτινυλιωμένη οραλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού. Γραμμές πλάτους α) 45 μm και β) 3.75 μm.



**Σχήμα 153.** Λιθογραφία φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που έχει προκύψει από διάλυμα (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) 45 ημερών πάνω σε υμένιο AZ5214 και πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οραλβουμίνης βοός. Η βιοτινυλιωμένη οραλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού. Γραμμές πλάτους 40 μm.

Παράλληλα παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου στις ίδιες συνθήκες με τις λιθογραφημένες επιφάνειες. Αναλυτικότερα παρασκευάστηκαν επτά δείγματα: Ένα υμένιο AZ5214 που είχε επιστρωθεί πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με

εξαμεθυλοδισιλαζάνη (AZ5214 αρχικό), τρία υμένια AZ5214 που είχαν υποστεί τη λιθογραφία, χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης, των φωτοευαίσθητων υμενίων της PVA, τα οποία προέκυψαν από τα διαλύματα της ίδιας ημέρας, 10 ημερών και 45 ημερών και τριών διασταυρωμένων υμενίων PVA πάνω σε υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφία με την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης στη λιθογραφική δόση, των φωτοευαίσθητων υμενίων της PVA, τα οποία προέκυψαν από τα διαλύματα της ίδιας ημέρας, 10 ημερών και 45 ημερών. Στη συνέχεια ακολούθησε η διεργασία για την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός, η οποία περιγράφηκε για τις λιθογραφημένες επιφάνειες (Σχήματα 151, 152 και 153) με τη μόνη διαφορά ότι τα δείγματα ελέγχου δεν εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός, αλλά εναποτέθηκαν σε αυτά σταγόνες βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (διαμέτρου ~ 2 mm) και επιπλέον μετρήθηκε ο φθορισμός μετά από την αντίδραση με τη στρεπταβιδίνη επισημασμένη με τη Alexa Fluor 546. Ο φθορισμός στο υμένιο AZ5214 που είχε επιστρωθεί πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (AZ5214 αρχικό) και στο οποίο είχε ακινητοποιηθεί η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός, η οποία είχε ανιχνευθεί μετά από αντίδραση με τη φθορισμοεπισημασμένη στρεπταβιδίνη τέθηκε ίσος με 100% και ο φθορισμός που μετρήθηκε από τα υπόλοιπα δείγματα υπολογίστηκε σχετικά με αυτόν (Σχήμα 154).



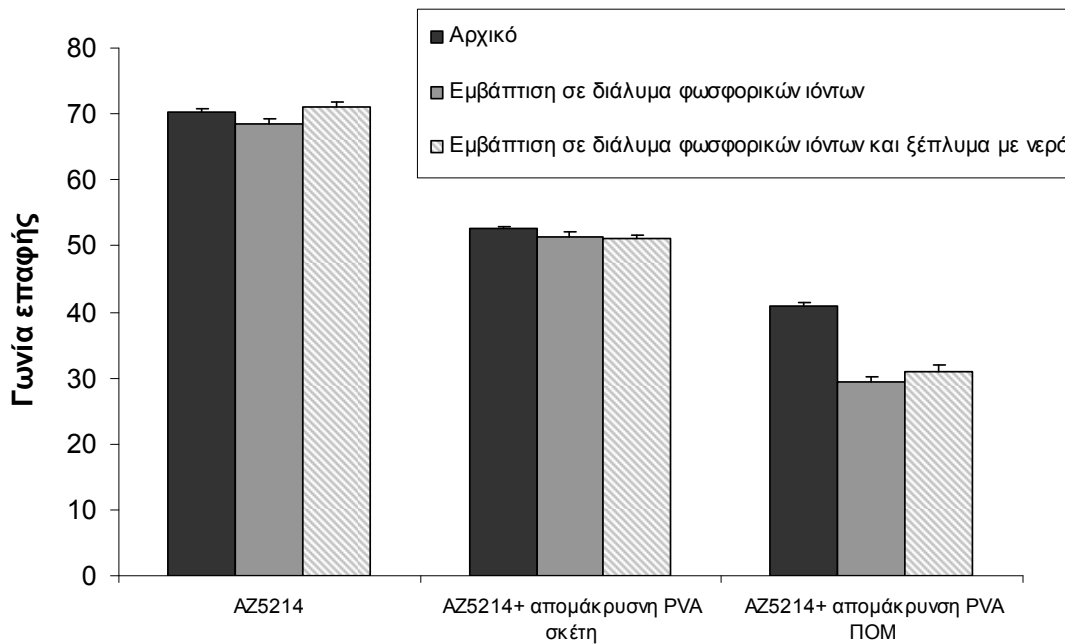
**Σχήμα 154.** Μετρήσεις φθορισμού που αφορούν την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Οι μετρήσεις αυτές προέκυψαν από την ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ακινητοποιήθηκε σε δείγματα, τα οποία προέκυψαν από τη λιθογραφία φωτοευαίσθητων διαλυμάτων PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. ΠΟΜ) της ίδιας ημέρας, 10 ημερών και 45 ημερών πάνω σε υμένια AZ5214. Ο σχετικός φθορισμός υπολογίστηκε σε σχέση με το υμένιο AZ5214 (AZ5214 αρχικό), του οποίου η ικανότητα πρόσδεσης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός τέθηκε ίση με 100 %.

Από τις λιθογραφίες (Σχήματα 151, 152 και 153) και από τα δείγματα ελέγχου (Σχήμα 154) παρατηρείται ότι η παλαιότητα του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA επηρεάζει την ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών στο υποκείμενο υμένιο AZ5214. Αναλυτικότερα παρατηρείται ότι όταν λιθογραφείται (χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) το διάλυμα που έχει γεράσει 10 ημέρες τότε η προσρόφηση της πρωτεΐνης στις περιοχές της AZ5214 ήταν μεγαλύτερη σε

σχέση με την προσρόφηση της πρωτεΐνης στις περιοχές της AZ5214 που έχουν υποστεί τη λιθογραφία (χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) των διαλυμάτων της ίδιας ημέρας και 45 ημερών. Επίσης παρατηρήθηκε (Σχήματα 151, 152, 153 και 154) ότι η βέλτιστη επιλεκτική προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός επιτεύχθηκε στις σχηματοποιημένες επιφάνειες που είχαν προκύψει από τη λιθογραφία του διαλύματος 10 ημερών πάνω στο υμένιο AZ5214.

Για το φωτοευαίσθητο διάλυμα PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) 10 ημερών, το οποίο έδωσε τα βέλτιστα αποτελέσματα στα πειράματα της φυσικής προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση στο υποκείμενο υμένιο AZ5214. Επιπλέον μελετήθηκε αν η γωνία επαφής τροποποιείται μετά την εμφάνιση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων, καθώς η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός που ακινητοποιήθηκε στις λιθογραφημένες επιφάνειες διαλύεται σε αυτό. Τα πειράματα αυτά έγιναν για να διαπιστωθεί αν οι προσροφημένες αλυσίδες PVA πάνω στο υμένιο AZ5214 απομακρύνονται μετά από την εμφάνιση του υμενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων, το οποίο είναι επιθυμητό για την επίτευξη των βέλτιστων αποτελεμάτων όσον αφορά τα πειράματα της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών.

Για να πραγματοποιηθούν αυτές οι μελέτες παρασκευάστηκαν εννέα δείγματα, στα οποία προσδιορίστηκαν οι γωνίες επαφής: 1) Υμένιο AZ5214, το οποίο επιστρώθηκε (συνθήκες επίστρωσης 3000 rpm για 30 sec) σε δίσκιο πυριτίου, που είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (συνθήκες επίστρωσης 7000 rpm για 30 sec). 2) Υμένιο AZ5214 το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 αλλά επιπλέον είχε εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05 M pH 7.4) για 1 h. 3) Υμένιο AZ5214 το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 2 και επιπλέον ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό και μετά μετρήθηκε η γωνία επαφής. 4) Υμένιο AZ5214 μετά την απομάκρυνση υμενίου PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση του υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA) στις ίδιες συνθήκες με το φωτοευαίσθητο υμένιο (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 70°C για 1 min (PAB) και στους 88°C για 3 min (PEB), εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 5) Υμένιο AZ5214 μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση υμενίου PVA το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 4 αλλά επιπλέον είχε εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05 M pH 7.4) για 1 h. 6) Υμένιο AZ5214 μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση υμενίου PVA το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 5 και επιπλέον ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό και μετά μετρήθηκε η γωνία επαφής. 7) Υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA 10 ημερών (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 70°C για 1 min (PAB) και στους 88°C για 3 min (PEB), εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 8) Υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 7 και επιπλέον είχε εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05 M pH 7.4) για 1 h. 9) Υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 8 και επιπλέον ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό και μετά μετρήθηκε η γωνία επαφής. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 155 έχουν προκύψει από τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία παρασκευάστηκαν τα ίδια δείγματα.



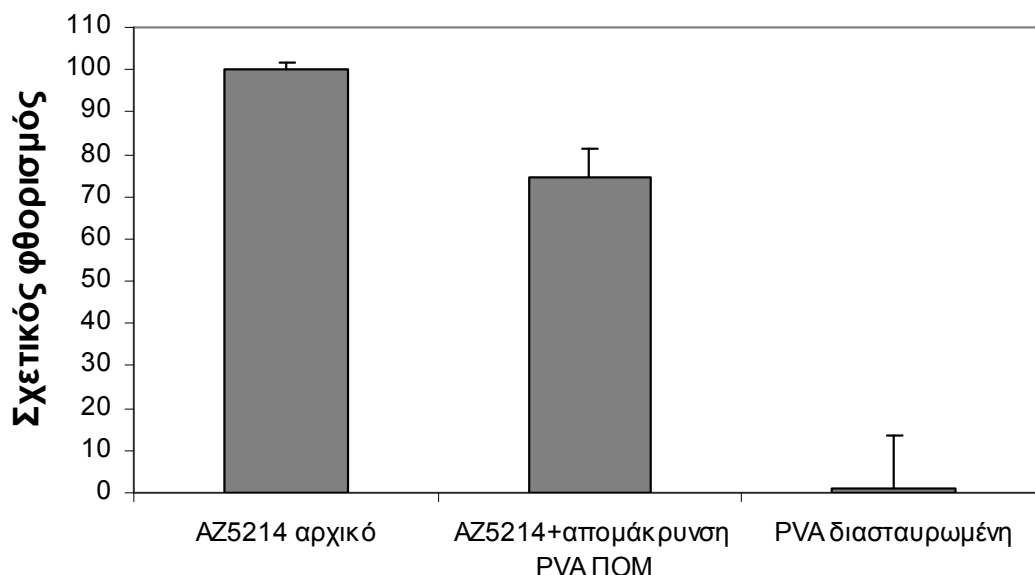
**Σχήμα 155.** Γωνίες επαφής υμενίων AZ5214, τα οποία έχουν υποστεί είτε τη λιθογραφία του φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA (διάλυμα 10 ημερών) είτε τη λιθογραφία διαλύματος PVA (PVA σκέτη) και σύγκρισή τους με αρχικά υμένια AZ5214. Επίσης συγκρίθηκαν με υμένια τα οποία είχαν εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και με υμένια τα οποία είχαν εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και είχαν ξεπλυθεί με απιονισμένο νερό.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 155 συμπεραίνεται ότι η εναπόθεση υμενίων PVA πάνω στα υμένια AZ5214 επηρεάζει τη γωνία επαφής του. Η μείωση της γωνίας επαφής των υμενίων AZ5214 αποδίδεται σε υπολείμματα που παραμένουν μετά την επίστρωση, τη θέρμανση και την εμφάνιση των υμενίων PVA. Τα υπολείμματα αυτά δεν απομακρύνονται μετά την εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων γιατί από το Σχήμα 155 παρατηρείται ότι οι γωνίες επαφής των υμενίων AZ5214 δεν επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα μετά την εμβάπτιση. Συγκρίνοντας τα δείγματα 1-9 συμπεραίνεται ότι η PVA (δείγματα 4-6) δεν επηρεάζει τόσο πολύ το υμένιο AZ5214 όσο το επηρεάζει η PVA με την POM (δείγματα 7-9), καθώς παρατηρείται ότι η γωνία επαφής του υμενίου AZ5214 μεταβάλλεται δραστικά όταν λιθογραφείται φωτοευαίσθητο υμένιο PVA που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), ενώ μεταβάλλεται λιγότερο όταν επιστρώνεται, θερμαίνεται και εμφανίζεται υμένιο PVA που δεν περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (4.3% κ.β. PVA). Επομένως το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (POM) θα ήταν επιθυμητό να αντικατασταθεί από κάποια άλλη ένωση με σκοπό το φωτοευαίσθητο διάλυμα της PVA να επηρεάζει λιγότερο το υποκείμενο υπόστρωμα (βλέπε Κεφάλαιο Γ.2.2.3.4.2).

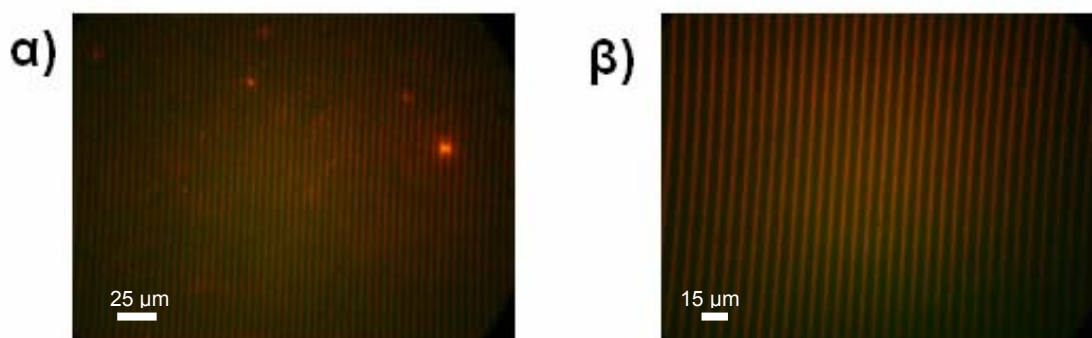
Στη συνέχεια για το διάλυμα 10 ημερών που έδωσε τα βέλτιστα αποτελέσματα επαναλήφθηκε το πείραμα φυσικής προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Τα αποτελέσματα από τα δείγματα ελέγχου παρουσιάζονται στο Σχήμα 156 και από τις λιθογραφημένες επιφάνειες στο Σχήμα 157.

Από το Σχήμα 156 παρατηρείται ότι το υποκείμενο υμένιο AZ5214 μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA 10 ημερών (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) διατηρεί την ικανότητα προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε ποσοστό 74% σε σχέση με το αρχικό υμένιο AZ5214, ενώ στο προηγούμενο πείραμα (Σχήμα 154) το υποκείμενο υμένιο AZ5214

μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA 10 ημερών (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) διατηρεί την ικανότητα προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε ποσοστό 54%. Επίσης από το Σχήμα 157 παρατηρείται ότι η επιλεκτική προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός είναι καλύτερη σε σχέση με το Σχήμα 152.



**Σχήμα 156.** Σχετικός φθορισμός των υμενίων που ήταν δείγματα ελέγχου. Οι μετρήσεις φθορισμού αφορούν την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Οι μετρήσεις αυτές προέκυψαν από την ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Συγκρίθηκε η ικανότητα προσρόφησης τριών υμενίων: AZ5214, AZ5214 που είχε υποστεί τη λιθογραφία φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) 10 ημερών και PVA διασταυρωμένη.



**Σχήμα 157.** Λιθογραφία φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA 10 ημερών (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) πάνω σε υμένιο AZ5214 και πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Γραμμές πλάτους α) 2.5 μm και β) 3.75 μm. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού.

Για να αποφευχθούν προβλήματα λόγω της γήρανσης των φωτοευαίσθητων διαλυμάτων της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα που είχαν αποθηκευτεί για 2 ημέρες (η θερμοκρασία αποθήκευσης είναι η θερμοκρασία περιβάλλοντος) και μελετήθηκαν άλλα υποστρώματα, τα οποία ενδεχομένως να επηρεάζονται λιγότερο σε σχέση με τα υμένια AZ5214.

### 2.2.3.2. Αυτοοργανωμένο μονομοριακό στρώμα 3-αμινοπροπυλο τριαιθοξυσιλανίου (APTES)

Το επόμενο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν το 3-αμινοπροπυλοτριοξυσιλάνιο (3-Aminopropyl triethoxysilane, APTES), το οποίο επιστρώθηκε σε δισκίο πυριτίου. Συγκεκριμένα τα βασικά στάδια της διεργασίας για την τροποποίηση του δισκίου πυριτίου με APTES ήταν: 1) Εμβάπτιση του δισκίου πυριτίου σε διάλυμα Piranha ( $H_2SO_4:H_2O_2$  50:50 (% v/v)) για 20 min 2) Εμβάπτιση για 20 min σε διάλυμα APTES 2% κ.ό διαλυμένο σε απιονισμένο νερό 3) Θέρμανση στους 120°C για 20 min 4) Εμβάπτιση σε απιονισμένο νερό και τοποθέτηση για 1min σε υπέρηχους.

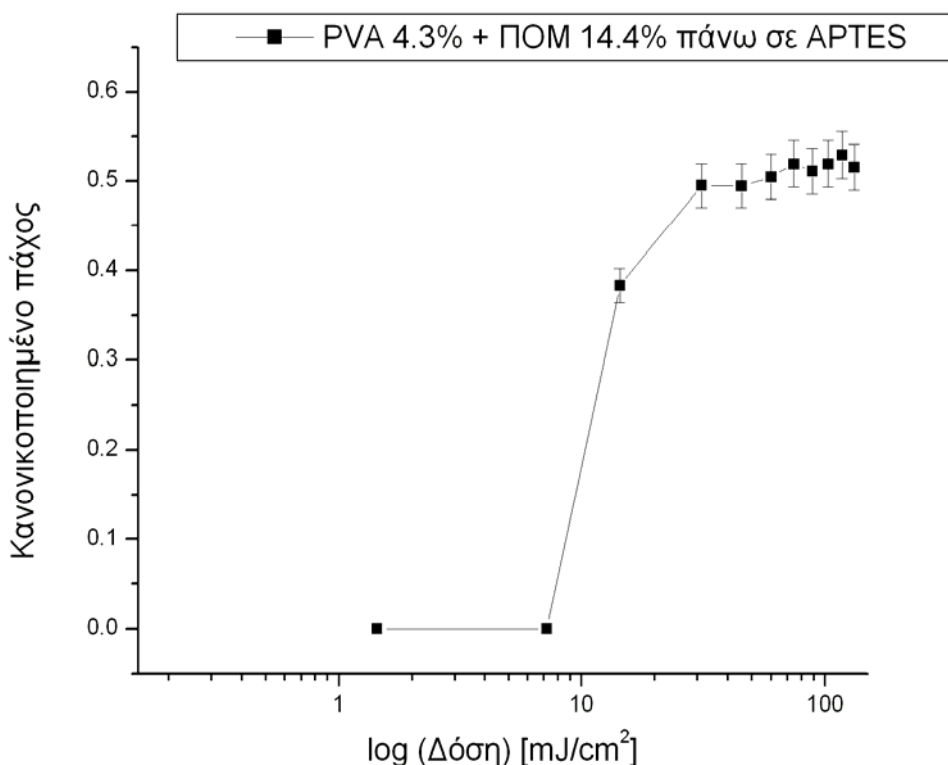
Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι γωνίες επαφής της αρχικής επιφάνειας του APTES, του APTES μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) παραλείποντας το στάδιο της έκθεσης και του διασταυρωμένου υμενίου της PVA μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με APTES (Πίνακας 17).

**Πίνακας 17.** Γωνίες επαφής των επιφανειών: 1) APTES 2) APTES μετά τη λιθογραφική διεργασία (χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) 3) Διασταυρωμένο υμένιο PVA μετά τη λιθογραφική διεργασία (με την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με APTES

Επιφάνεια	Γωνίες επαφής
APTES	51°
APTES μετά τη λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA	34°
PVA διασταυρωμένη	65°

Από τις γωνίες επαφής των επιφανειών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 17 παρατηρείται ότι η γωνία επαφής του APTES μετά τη λιθογραφική διεργασία (χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) μειώνεται αρκετά. Η μείωση της γωνίας επαφής του APTES είναι πιθανόν να οφείλεται σε υπολείμματα που παραμένουν στο APTES μετά την επίστρωση, τη θέρμανση και την εμφάνιση των φωτοευαίσθητων υμενίων της PVA.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η λιθογραφική δόση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), στην οποία είναι απαραίτητο να εκτεθεί προκειμένου να επιτευχθεί η σχηματοποίηση της PVA πάνω από το APTES (Σχήμα 158). Αναλυτικότερα στο δισκίο πυριτίου, που είχε τροποποιηθεί με APTES, επιστρώθηκε το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Στη συνέχεια το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω φίλτρου στα 254 nm σε διάφορες δόσεις προκειμένου να προσδιοριστεί η λιθογραφική δόση. Ακολούθως, έγινε θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min.



**Σχήμα 158.** Καμπύλη αντίθεσης του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), το οποίο είχε επιστρωθεί πάνω σε ΑΜΣ ΑΡΤΕΣ.

Από την καμπύλη αντίθεσης του Σχήματος 158 παρατηρείται ότι η απώλεια πάχους του τελικού υμενίου δεν σταθεροποιείται και εικάζεται ότι αυξάνοντας τη δόση παραμένει κάποια ποσότητα POM στην πολυμερική μήτρα. Γι' αυτό το λόγο στο πείραμα που αφορούσε την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 159) εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές δόσεις προκειμένου να μελετηθεί περισσότερο αυτή η παρατήρηση.

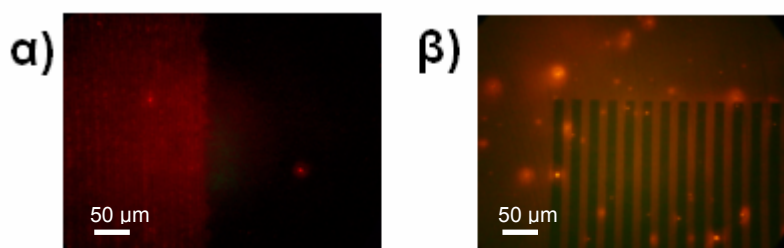
Για να διαλευκανθεί αν το ΑΡΤΕΣ είναι κατάλληλο υπόστρωμα για την επιλεκτική προσρόφηση πρωτεϊνών με εφαρμογή της προτεινόμενης διεργασίας που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 144 πραγματοποιήθηκε πείραμα για την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 159). Αναλυτικότερα παρασκευάστηκαν δομές PVA πάνω σε ΑΡΤΕΣ ως εξής: Στο δισκίο πυριτίου, που είχε τροποποιηθεί με ΑΡΤΕΣ, επιστρώθηκε το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (ΡΑΒ) στους 70 °C για 1 min. Στη συνέχεια, το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω μάσκας και μέσω φίλτρου στα 254 nm σε δόση έκθεσης 31 mJ/cm<sup>2</sup> που αντιστοιχεί στην απώλεια πάχους 58% (Πίνακας 18). Ακολούθως, έγινε θέρμανση (ΡΕΒ) στους 88 °C για 3 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min.

Επίσης, παρασκευάστηκαν δομές PVA πάνω σε ΑΡΤΕΣ ακολουθώντας την ίδια διεργασία, μόνο που, στο στάδιο της έκθεσης το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω μάσκας και μέσω φίλτρου στα 254 nm σε δόση έκθεσης 51 mJ/cm<sup>2</sup> που αντιστοιχεί στην απώλεια πάχους 50% (Πίνακας 18).

**Πίνακας 18.** Πάχη των υμενίων: 1) Υμένιο PVA με ΠΟΜ (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. ΠΟΜ) πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με APTES, το οποίο επιστρώθηκε στις 4000 rpm για 30 sec και θερμάνθηκε (PAB) στους 70 °C για 1 min (APTES+PVA ΠΟΜ αρχικό). 2) Υμένιο διασταυρωμένης PVA μετά τη λιθογραφική διεργασία του (με την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης σε δόση 31 mJ/cm<sup>2</sup>) φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. ΠΟΜ) πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με APTES. 3) Υμένιο διασταυρωμένης PVA μετά τη λιθογραφική διεργασία του (με την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης σε δόση 51 mJ/cm<sup>2</sup>) φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με APTES.

Υμένια	Πάχος (nm)
APTES+PVA ΠΟΜ αρχικό	102
APTES+ PVA διασταυρωμένη με εφαρμογή δόσης έκθεσης 31 mJ/cm <sup>2</sup>	43
APTES+ PVA διασταυρωμένη με εφαρμογή δόσης έκθεσης 51 mJ/cm <sup>2</sup>	51

Στη συνέχεια, οι λιθογραφημένες επιφάνειες εμβαπτίστηκαν για 1 h σε διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 μg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Έπειτα οι επιφάνειες ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Στη συνέχεια εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Ακολούθως, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και τέλος ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Εικόνες από την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε λιθογραφημένες επιφάνειες δίνονται στο Σχήμα 159.



**Σχήμα 159.** Λιθογραφία φωτοευαίσθητου υμενίου PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. ΠΟΜ) πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με APTES και πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Γραμμές πλάτους PVA α) 6.25 μm που δημιουργήθηκαν με δόση 31 mJ/cm<sup>2</sup> και β) 12.5 μm που δημιουργήθηκαν με δόση 51 mJ/cm<sup>2</sup>. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού.

Από το Σχήμα 159 παρατηρείται ότι, στις λιθογραφημένες επιφάνειες όπου οι δομές της PVA είχαν δημιουργηθεί με την εφαρμογή της δόσης έκθεσης 31 mJ/cm<sup>2</sup>, η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ακινητοποιήθηκε στο ΑΜΣ του APTES (Σχήμα 159 α), ενώ στις λιθογραφημένες επιφάνειες όπου οι δομές της PVA είχαν δημιουργηθεί με την εφαρμογή της δόσης έκθεσης 51 mJ/cm<sup>2</sup> η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ακινητοποιήθηκε στη διασταυρωμένη PVA (Σχήμα 159 β).

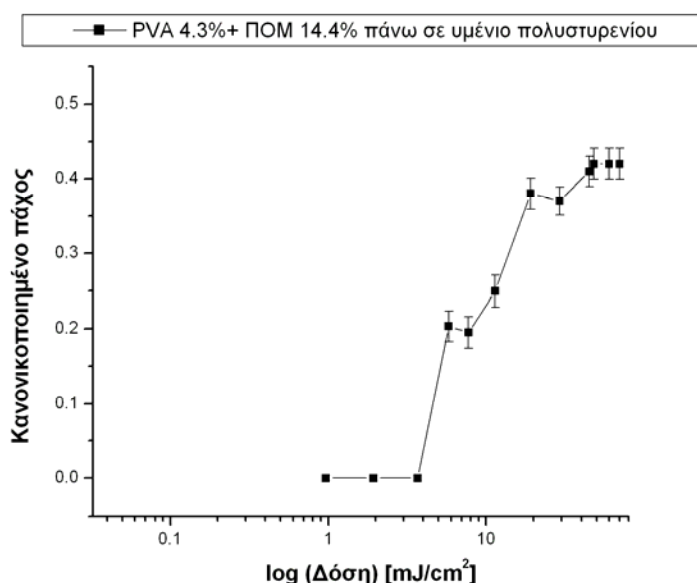


Ενδεχομένως με την εφαρμογή μεγαλύτερης δόσης έκθεσης το πλέγμα που δημιουργείται στη διασταυρωμένη PVA να είναι πιο πυκνό και ταυτόχρονα το 12 – βολφραμοφωσφορικό οξύ να αντιδρά με το 3-αμινοπροπυλο-τριαθοξυσιλάνιο (APTES) με αποτέλεσμα να μην απομακρύνεται πλήρως κατά το στάδιο της εμφάνισης. Η παραμονή του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος στην πολυμερική μήτρα ερμηνεύει τη μικρότερη απώλεια πάχους (Πίνακας 18). Επίσης, τα υπολείμματα του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος στο τελικό υμένιο της διασταυρωμένης PVA είναι πιθανόν να αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός με αποτέλεσμα η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός να ακινητοποιείται πάνω στις δομές της διασταυρωμένης PVA.

### 2.2.3.3. Υμένιο πολυστυρενίου

#### 2.2.3.3.1. Μελέτη της επίδρασης της λιθογραφικής διεργασίας του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA στο υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου

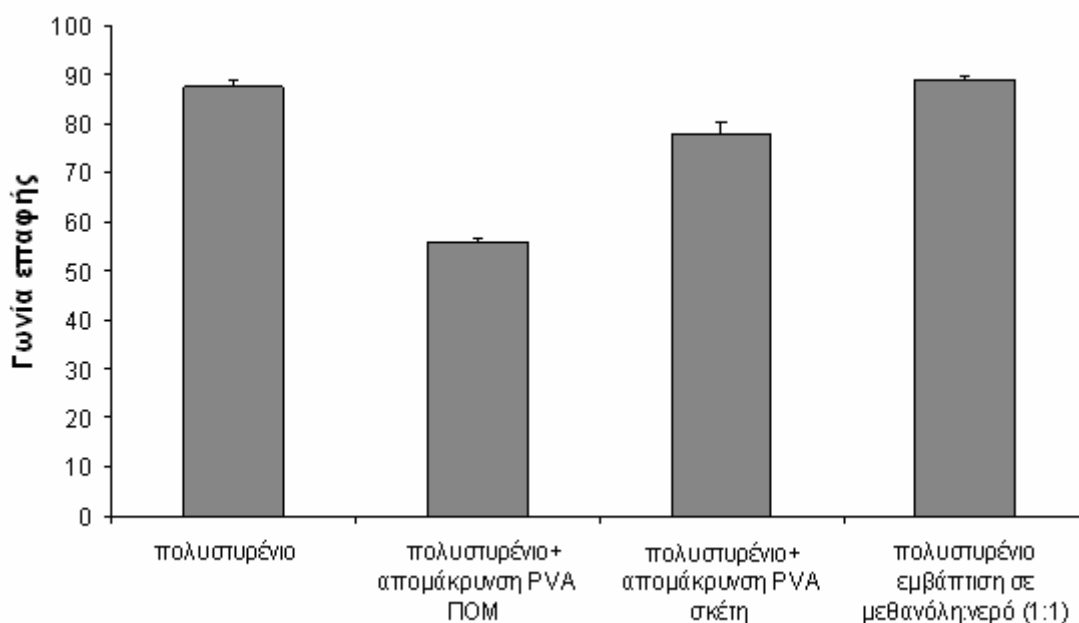
Το επόμενο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν το πολυστυρένιο. Αρχικά προσδιορίστηκε η λιθογραφική δόση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), στην οποία είναι απαραίτητο να εκτεθεί προκειμένου να επιτευχθεί η σχηματοποίηση της PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου (Σχήμα 160). Αναλυτικότερα, το δισκίο πυριτίου τροποποιήθηκε με εξαμεθυλοδισιλιζάνη (επίστρωση στις 4000 rpm για 1 min). Στη συνέχεια, επιστρώθηκε διάλυμα πολυστυρενίου 2% κ.β. διαλυμένο σε Μεθυλο Ισοβουτυλο Κετόνη (MIBK) στις 2000 rpm για 1 min. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε θέρμανση στους 120°C για 5 min. Στη συνέχεια, επιστρώθηκε το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Κατόπιν, το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω φίλτρου στα 254 nm σε διάφορες δόσεις προκειμένου να προσδιοριστεί η λιθογραφική δόση. Ακολούθως, έγινε θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min.



Σχήμα 160. Καμπύλη αντίθεσης του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), το οποίο είχε επιστρωθεί πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου.

Από την καμπύλη αντίθεσης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 160 βρέθηκε ότι η λιθογραφική δόση είναι  $31 \text{ mJ/cm}^2$ .

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της PVA στο υμένιο του πολυστυρενίου μέσω των γωνιών επαφής (Σχήμα 161). Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης παρασκευάστηκαν τέσσερα δείγματα: 1) Υμένιο πολυστυρενίου. 2) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους  $70^\circ\text{C}$  για 1 min (PAB) και στους  $88^\circ\text{C}$  για 3 min (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA) απουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (PVA σκέτη). 3) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους  $70^\circ\text{C}$  για 1 min (PAB) και στους  $88^\circ\text{C}$  για 3 min (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM). 4) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την εμφύσηση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min. Τα υμένια πολυστυρενίου επιστρώθηκαν πάνω σε δισκίο πυριτίου (επίστρωση στις 2000 rpm για 1 min από διάλυμα πολυστυρενίου 2% κ.β. διαλυμένο σε MIBK, θέρμανση στους  $120^\circ\text{C}$  για 5 min), το οποίο είχε αρχικά τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (επίστρωση 4000 rpm για 1 min).

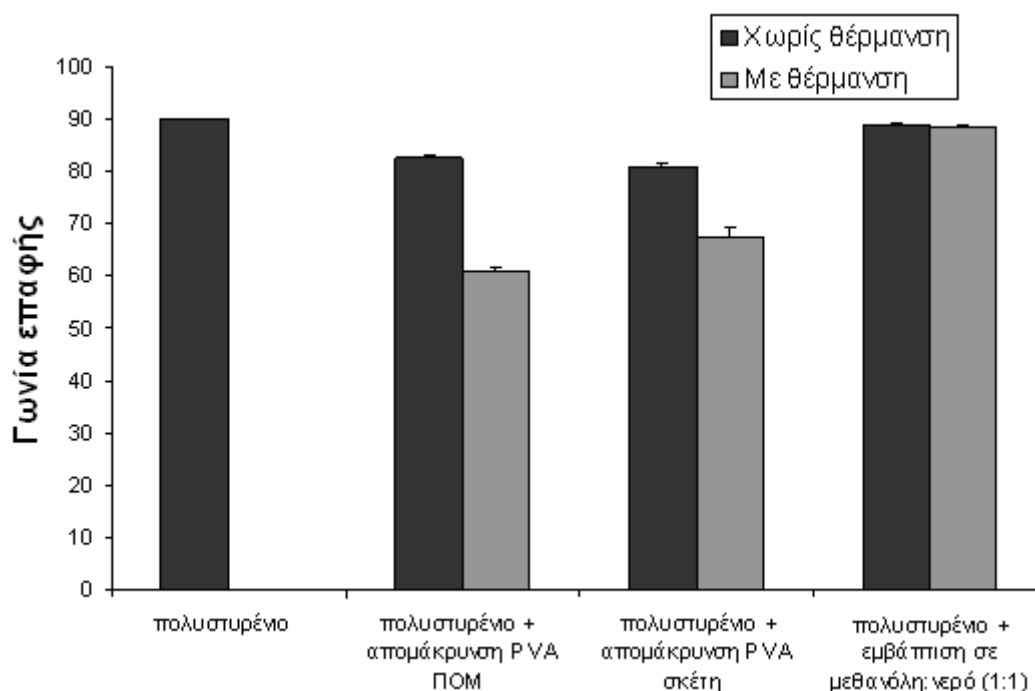


**Σχήμα 161.** Γωνίες επαφής των υμενίων πολυστυρενίου τα οποία είχαν υποστεί τη λιθογραφία του υμενίου της PVA, του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA και εμφύσηση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 161 συμπεραίνεται ότι το πολυστυρένιο δεν επηρεάζεται από την εμφύσηση στο διάλυμα μεθανόλης νερού, ενώ επηρεάζεται από την εναπόθεση υμενίων PVA. Η μείωση της γωνίας επαφής των υμενίων πολυστυρενίου στα δείγματα που έχουν επιστρωθεί υμένια PVA αποδίδεται σε υπολείμματα που παραμένουν στο πολυστυρένιο μετά την επίστρωση, τη θέρμανση και την εμφάνιση των υμενίων PVA. Τα υπολείμματα αυτά δεν απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της εμφάνισης ούτε κατά τη διάρκεια του ξεπλύματος με απιονισμένο νερό που έπεται του σταδίου της εμφάνισης. Το υμένιο πολυστυρενίου που υφίσταται τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου

υμενίου της PVA επηρεάζεται περισσότερο σε σχέση με το υμένιο πολυστυρενίου στο οποίο επιστρώνεται, θερμαίνεται και εμφανίζεται το υμένιο της σκέτης PVA.

Για να εξεταστεί αυτή η παρατήρηση παρασκευάστηκαν επτά δείγματα και κατεγράφησαν οι γωνίες επαφής (Σχήμα 162): 1) Υμένιο πολυστυρενίου. 2) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος παραλείποντας τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB). 3) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM). 4) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min της PVA απουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος παραλείποντας τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB). 5) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min της PVA απουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (PVA σκέτη). 6) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την εμφάπτιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min. 7) Υμένιο πολυστυρενίου μετά τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάπτιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min. Τα υμένια πολυστυρενίου επιστρώθηκαν πάνω σε δίσκιο πυριτίου (επίστρωση στις 2000 grm για 1 min από διάλυμα πολυστυρενίου 2% κ.β. διαλυμένο σε MIBK, θέρμανση στους 120 °C για 5 min), το οποίο είχε αρχικά τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (επίστρωση 4000 grm για 1 min).

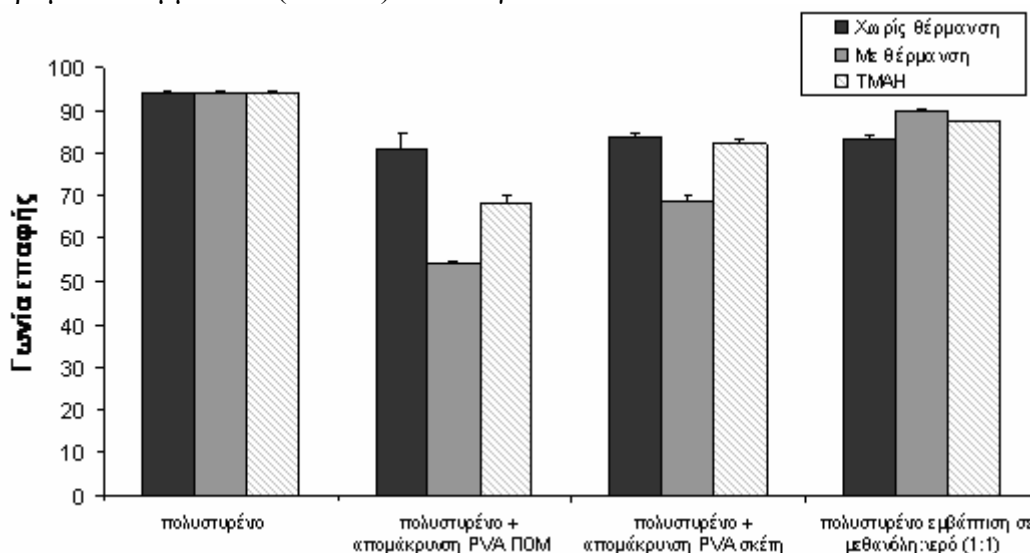


**Σχήμα 162.** Γωνίες επαφής των υμενίων πολυστυρενίου τα οποία είχαν υποστεί τη λιθογραφία του υμενίου της PVA, του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA και εμφάπτιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v είτε χωρίς είτε με την πραγματοποίηση των σταδίων της θέρμανσης (PAB στους 70 °C για 1 min και PEB στους 88 °C για 3 min).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 162 συμπεραίνεται ότι το πολυστυρένιο επηρεάζεται από την επίστρωση των υμενίων της PVA ειδικά όταν

πραγματοποιούνται τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB), γιατί όταν αυτά δεν πραγματοποιούνται η γωνία επαφής του δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα από την επίστρωση και την εμφάνιση των υμενίων. Επίσης παρατηρείται ότι το φωτοευαίσθητο διάλυμα της PVA που περιέχει 14.4% ΠΟΜ επηρεάζει αρκετά τη γωνία επαφής του υποκείμενου πολυστυρενίου όταν στη λιθογραφία συμπεριλαμβάνονται τα στάδια της θέρμανσης. Η μεταβολή αυτή στις γωνίες επαφής του υποκείμενου πολυστυρενίου αποδίδεται σε υπολείμματα PVA. Τα υπολείμματα αυτά μπορούν να αποδοθούν στην αφυδάτωση της PVA η οποία λαμβάνει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία (PAB στους 70 °C για 1 min και PEB στους 88 °C για 3 min). Η αφυδάτωση αυτή είναι εντονότερη παρουσία οξέος, δηλαδή όταν υπάρχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ στην πολυμερική μήτρα. Οι αλυσίδες της αφυδατωμένης PVA περιέχουν διπλούς δεσμούς οι οποίοι πιθανώς βοηθούν στην ακινητοποίησή τους μέσω φυσικής προσρόφησης στο υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου.

Στη συνέχεια, για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων παρασκευάστηκαν τα ίδια δείγματα με το προηγούμενο πείραμα, δηλαδή παρασκευάστηκαν τα επτά δείγματα που παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 162 και επιπλέον παρασκευάστηκαν ακόμα τρία δείγματα: 8) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. ΠΟΜ) και εμφάπτιση σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (TMAH) 0.26 N για 5 min. 9) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88°C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min της PVA απουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (PVA σκέτη) και εμφάπτιση σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (TMAH) 0.26 N για 5 min. 10) Υμένιο πολυστυρενίου μετά τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάπτιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min και εμφάπτιση σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (TMAH) 0.26 N για 5 min.



**Σχήμα 163.** Γωνίες επαφής των υμενίων πολυστυρενίου τα οποία είχαν υποστεί τη λιθογραφία του υμενίου της PVA, του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA και εμφάπτιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v είτε χωρίς είτε με την πραγματοποίηση των σταδίων της θέρμανσης (PAB στους 70 °C για 1 min και PEB στους 88 °C για 3 min) και πραγματοποίηση ενός επιπλέον σταδίου εμφάπτισης των επιφανειών σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (TMAH) 0.26 N για 5 min.

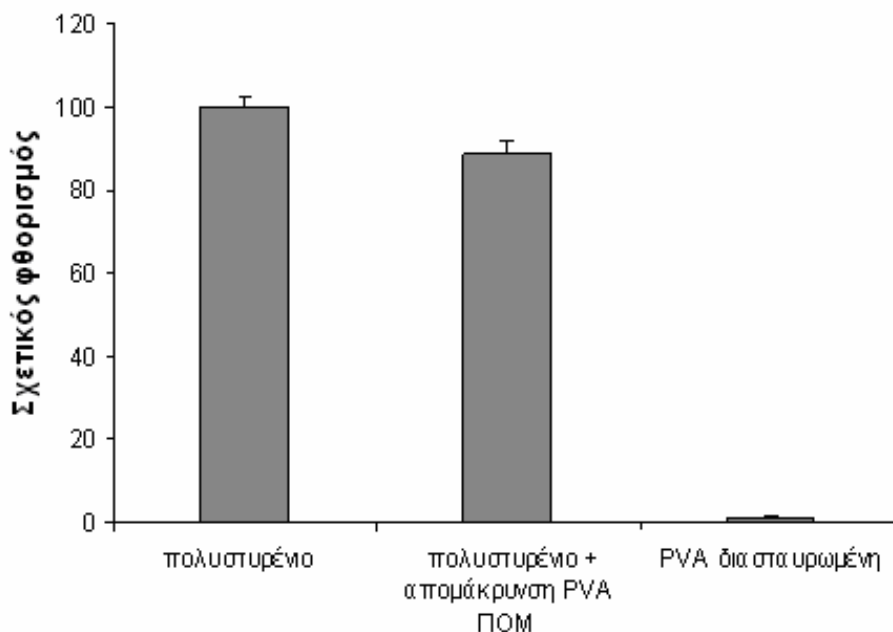
Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 163 παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα, δηλαδή το πολυστυρένιο επηρεάζεται από τα στάδια της θέρμανσης, γιατί όταν αυτά δεν πραγματοποιούνται η γωνία επαφής του δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα από την επίστρωση και την εμφάνιση των υμενίων. Και παρατηρείται ξανά ότι το φωτοευαίσθητο διάλυμα της PVA που περιέχει 14.4% κ.β. POM επηρεάζει αρκετά το υποκείμενο πολυστυρένιο όταν στη λιθογραφία συμπεριλαμβάνονται τα στάδια της θέρμανσης. Η εμφάνιση σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (TMAH) 0.26 N για 5 min βελτιώνει τα αποτελέσματα στα δείγματα πολυ(στυρενίου), τα οποία είχαν έντονη μεταβολή στις γωνίες επαφής. Επειδή η προσρόφηση των πρωτεϊνών ήταν ικανοποιητική (Σχήμα 164) δεν θεωρήθηκε απαραίτητο να γίνεται εμφάνιση σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου (TMAH) 0.26 N για 5 min.

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν η μεταβολή στην επιφάνεια του πολυστυρενίου επηρεάζει την ικανότητα προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός (Σχήμα 164). Γι' αυτή τη μελέτη κατασκευάστηκαν τρία δείγματα: 1) Πολυστυρένιο αρχικό, το οποίο επιστρώθηκε στις 2000 rpm για 1 min από διάλυμα 2% κ.β. διαλύματος πολυστυρενίου διαλυμένου σε MIBK σε δισκίο πυριτίου που είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (επίστρωση στις 4000 rpm για 1 min). Έπειτα από την επίστρωση του πολυστυρενίου πραγματοποιήθηκε θέρμανση στους 120 °C για 5 min 2) Πολυστυρένιο μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA. Το υμένιο πολυστυρενίου είχε παρασκευαστεί στις ίδιες συνθήκες με το δείγμα 1 και στη συνέχεια δέχθηκε τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (Επίστρωση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min, (PEB) στους 88 °C για 3 min και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min). 3) Διασταυρωμένο υμένιο PVA μετά τη λιθογραφική διεργασία (με την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου.

Ακολούθως, στα τρία δείγματα εναποτέθηκαν για 1 h σταγόνες (διαμέτρου ~ 2 mm) διαλύματος βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 µg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια, τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται για 1 h σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Έπειτα, τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Στη συνέχεια, εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 µL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και τέλος, ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 164 το πολυστυρένιο μετά την λιθογραφική διεργασία (χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) διατηρεί σε ικανοποιητικό βαθμό την ικανότητα φυσικής προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Συγκεκριμένα το υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου διατηρεί το 88% της ικανότητας προσρόφησης του αρχικού υμενίου πολυστυρενίου. Επομένως, το πολυ(στυρένιο) δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA ως προς την ικανότητα φυσικής προσρόφησης των

πρωτεϊνών. Επίσης, παρατηρείται ότι η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός δεν ακινητοποιείται στο υμένιο της διασταυρωμένης PVA, όπως ήταν αναμενόμενο και από προηγούμενα πειράματα.



**Σχήμα 164.** Σχετικός φθορισμός δειγμάτων για τη μελέτη της επίδρασης της λιθογραφικής διεργασίας του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA στο υμένιο πολυστυρενίου. Οι μετρήσεις φθορισμού αφορούν την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Οι μετρήσεις αυτές προέκυψαν από την ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός μέσω της αντίδρασης με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Συγκρίθηκε η ικανότητα προσρόφησης τριών υμενίων: πολυστυρένιο, πολυστυρένιο που είχε υποστεί τη λιθογραφία φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) και PVA διασταυρωμένη.

Από πειράματα φυσικής προσρόφησης παρατηρήθηκε ότι για να επιτευχθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα επιλεκτικής προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στις σχηματοποιημένες επιφάνειες διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου είναι αναγκαίο το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA να έχει εκτεθεί στην απαραίτητη λιθογραφική δόση. Αν το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτεθεί σε δόσεις μικρότερες τότε το πλέγμα της διασταυρωμένης PVA που δημιουργείται δεν είναι πυκνό με αποτέλεσμα να μην καλύπτει επαρκώς το υμένιο πολυστυρενίου και να ακινητοποιείται σε αυτό η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός. Για αυτήν την μελέτη κατασκευάστηκαν έξι δείγματα: Α) Πολυστυρένιο αρχικό, το οποίο επιστρώθηκε στις 2000 rpm για 1 min από διάλυμα 2% κ.β. διαλύματος πολυστυρενίου διαλυμένου σε MIBK σε δισκίο πυριτίου που είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (επίστρωση στις 4000 rpm για 1 min). Έπειτα από την επίστρωση του πολυστυρενίου πραγματοποιήθηκε θέρμανση στους 120 °C για 5 min. Β) Λιθογραφημένες επιφάνειες PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου, οι οποίες προέκυψαν από διαφορετικές δόσεις έκθεσης του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) πάνω στο υμένιο πολυστυρενίου. Αναλυτικά οι συνθήκες για τις λιθογραφίες ήταν: Επίστρωση της εξαμεθυλοδισιλαζάνης στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου. Έπειτα επίστρωση του 2% κ.β. διαλύματος πολυστυρενίου διαλυμένου σε MIBK στις 2000 rpm για 1 min και θέρμανση στους 120°C για 5 min. Έπειτα επιστρώθηκε το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Στη συνέχεια το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω μάσκας λιθογραφίας και μέσω φίλτρου στα 254

nm σε διαφορετικές δόσεις έκθεσης προκειμένου να κατασκευαστούν οι σχηματοποιημένες επιφάνειες PVA πάνω στο υμένιο πολυστυρενίου. Οι δόσεις έκθεσης που εφαρμόστηκαν ήταν: 15, 20, 28, 40, 74 mJ/cm<sup>2</sup>. Ακολούθως, έγινε θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min και πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min. Αρχικά προσδιορίστηκε το πάχος των παραγόμενων υμενίων διασταυρωμένης PVA (Πίνακας 19).

**Πίνακας 19.** Πάχος υμενίων διασταυρωμένης PVA μετά από έκθεση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. ΠΟΜ) σε διαφορετικές δόσεις έκθεσης

Δόση έκθεσης (mJ/cm <sup>2</sup> )	Πάχος υμενίων διασταυρωμένης PVA (nm)
15	44
20	61
28	66
40	67
74	78

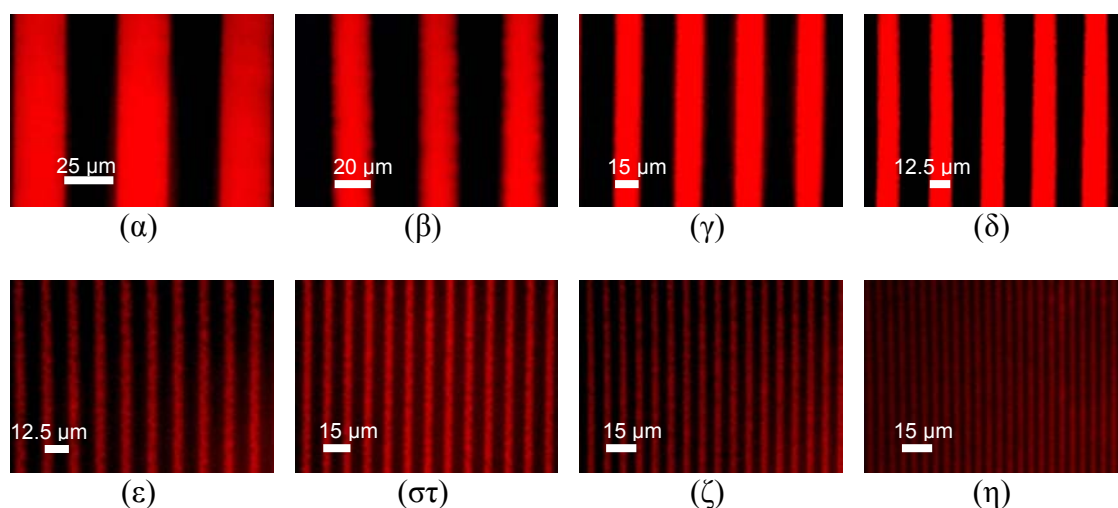
Στη συνέχεια οι λιθογραφημένες επιφάνειες εμβαπτίστηκαν για 1 h σε διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 μg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια οι επιφάνειες ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Ακολούθως, μετρήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης από τις περιοχές του πολυστυρενίου και από τις περιοχές της διασταυρωμένης PVA μέσω μετρήσεων φθορισμού.

Παρατηρήθηκε ότι η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ακινητοποιείται σε διασταυρωμένο υμένιο PVA μικρού πάχους. Αυτό συμβαίνει γιατί το πλέγμα της διασταυρωμένης PVA δεν είναι πυκνό με αποτέλεσμα να μην καλύπτει επαρκώς το υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου με αποτέλεσμα να προσροφάται σε αυτό η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός. Η πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στη διασταυρωμένη PVA, που επικαλύπτει το υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου ελαττώνεται όταν προσεγγίζουμε το μέγιστο πάχος. Αυτό οφείλεται στην πλήρη κάλυψη του υποκείμενου υμενίου πολυστυρενίου, καθώς παρατηρήθηκε ότι η πρόσδεση στο υποκείμενο στρώμα πολυστυρενίου είναι σταθερή. Επομένως, για να επιτευχθεί η καλύτερη επιλεκτική προσρόφηση πρέπει να έχει πραγματοποιηθεί πλήρης διασταύρωση της PVA στη λιθογραφική δόση. Για τα υμένια PVA τα οποία είχαν προκύψει από δόση έκθεσης 28 mJ/cm<sup>2</sup> παρατηρήθηκε η καλύτερη επιλεκτική προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στις περιοχές του πολυστυρενίου καθώς η σχετική ένταση φθορισμού από τις περιοχές του πολυστυρενίου ήταν 120 φορές πολλαπλάσια της έντασης φθορισμού από τις περιοχές της διασταυρωμένης PVA.

### 2.2.3.3.2. Σχηματοποίηση πρωτεϊνών

Μετά από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκαν λιθογραφίες των φωτοευαίσθητων υμενίων της PVA πάνω σε υμένα πολυστυρενίου στη λιθογραφική δόση. Αναλυτικά οι συνθήκες για τις λιθογραφίες ήταν: Επίστρωση της εξαμεθυλοδισιλαζάνης στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου. Έπειτα επίστρωση του 2% κ.β. διαλύματος πολυστυρενίου διαλυμένου σε MIBK στις 2000 rpm για 1 min και θέρμανση στους 120°C για 5 min. Έπειτα επιστρώθηκε το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min. Στη συνέχεια το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV μέσω μάσκας λιθογραφίας και μέσω φίλτρου στα 254 nm στη λιθογραφική δόση προκειμένου να κατασκευαστούν οι σχηματοποιημένες επιφάνειες PVA πάνω στο υμένιο πολυστυρενίου. Ακολούθως, έγινε θέρμανση (PEB) στους 88 °C για 3 min και πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min.

Οι λιθογραφημένες επιφάνειες εμβαπτίστηκαν για 1 h σε διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια οι επιφάνειες ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Στη συνέχεια εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα τα υμένα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και τέλος ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ .



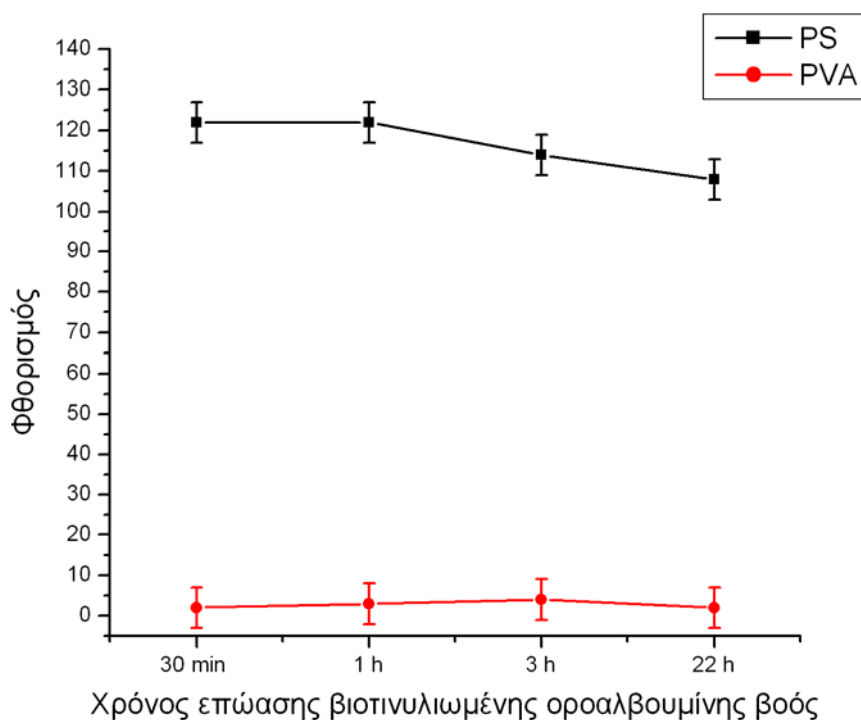
**Σχήμα 165.** Λιθογραφία φωτοευαίσθητου υμενίου PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) πάνω σε δισκίο πυριτίου τροποποιημένο με υμένιο πολυστυρενίου και πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο φθορισμού. Γραμμές πλάτους α) 25  $\mu\text{m}$  β) 20  $\mu\text{m}$  γ) 15  $\mu\text{m}$  δ) 12.5  $\mu\text{m}$  ε) 6.25  $\mu\text{m}$  στ) 5  $\mu\text{m}$  ζ) 3.75  $\mu\text{m}$  η) 2.5  $\mu\text{m}$ .

Στις λιθογραφημένες επιφάνειες (Σχήμα 165) παρατηρείται ότι η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός προσδένεται στο πολυστυρένιο και όχι στη διασταυρωμένη PVA. Η επιλεκτική προσρόφηση στις περιοχές του πολυστυρενίου



έναντι των περιοχών της διασταυρωμένης PVA είναι ικανοποιητική. Με την εφαρμογή της μεθόδου επιτεύχθηκε η κατασκευή δομών μέχρι 2.5  $\mu\text{m}$ , στις οποίες ακινητοποιήθηκε η βιοτυνλιωμένη οροαλβουμίνη βοός. Επομένως, οι σχηματοποιημένες επιφάνειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πραγματοποίηση βιομοριακών αντιδράσεων επιλεκτικά στις περιοχές πολυστυρενίου έναντι των περιοχών της διασταυρωμένης PVA.

Έπειτα, μελετήθηκε αν οι σχηματοποιημένες επιφάνειες ανθίστανται στην προσρόφηση της βιοτυνλιωμένης οροαλβουμίνης βοός μετά από μεγάλους χρόνους επώασης σε διάλυμά της (Σχήμα 166). Γι' αυτό το λόγο τέσσερις λιθογραφημένες επιφάνειες που κατασκευάστηκαν με τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν στο προηγούμενο πείραμα εμβαπτίστηκαν για 30 min, 1 h, 3 h και 22 h σε διάλυμα βιοτυνλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια, οι επιφάνειες ξεπλένονται και εμβαπτίζονται για 1 h σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10  $\text{g}/\text{L}$  διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Μετά, εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10  $\text{g}/\text{L}$ . Έπειτα, τα υμένια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και τέλος ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ .

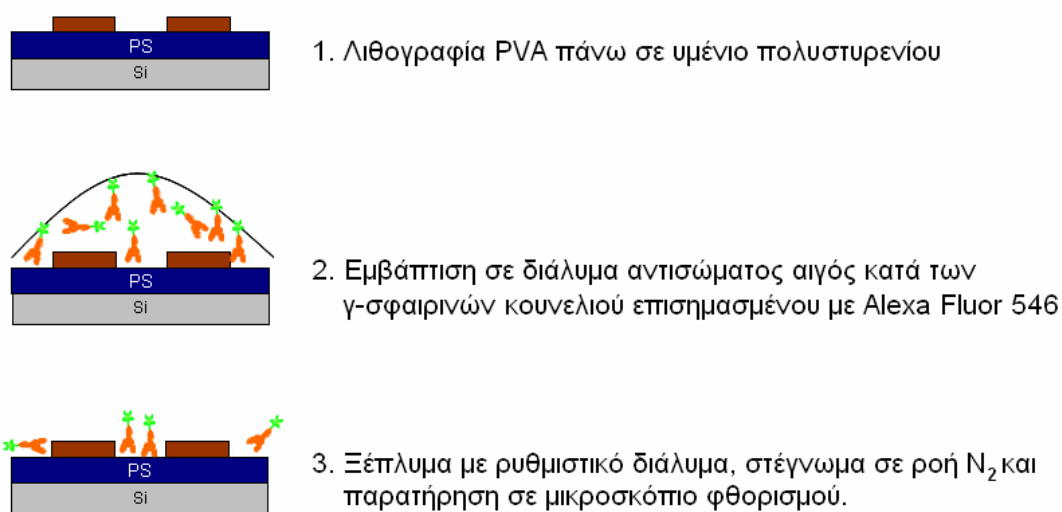


**Σχήμα 166.** Σήματα φθορισμού για τα δύο υλικά: πολυστυρένιο (■) και PVA (●) για τη βιοτυνλιωμένη οροαλβουμίνη βοός για διαφορετικούς χρόνους επώασης σχηματοποιημένων δομών διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της ικανότητας πρόσδεσης των υμενίων.

Από το Σχήμα 166 παρατηρείται ότι η επιλεκτική προσρόφηση της βιοτυνλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στις περιοχές του πολυστυρενίου έναντι των περιοχών της διασταυρωμένης PVA είναι σταθερή και μετά από μεγάλους χρόνους

επώασης των λιθογραφημένων επιφανειών στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Η σχετική ένταση φθορισμού από τις περιοχές του πολυστυρενίου ήταν 120 φορές πολλαπλάσια της έντασης φθορισμού από τις περιοχές της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης) για χρόνο επώασης 30 min στο διάλυμα της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός, ενώ μετά από 22 h επώασης η σχετική ένταση φθορισμού από τις περιοχές του πολυστυρενίου ήταν 108 φορές πολλαπλάσια της έντασης φθορισμού από τις περιοχές της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης). Είναι σημαντικό, επίσης, να παρατηρηθεί ότι το σήμα φθορισμού από τις περιοχές της διασταυρωμένης PVA είναι σχεδόν μηδενικό δείχνοντας πλήρη αποτροπή της πρόσδεσης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός, ακόμα, και μετά από 22 h επώαση στο διάλυμα της.

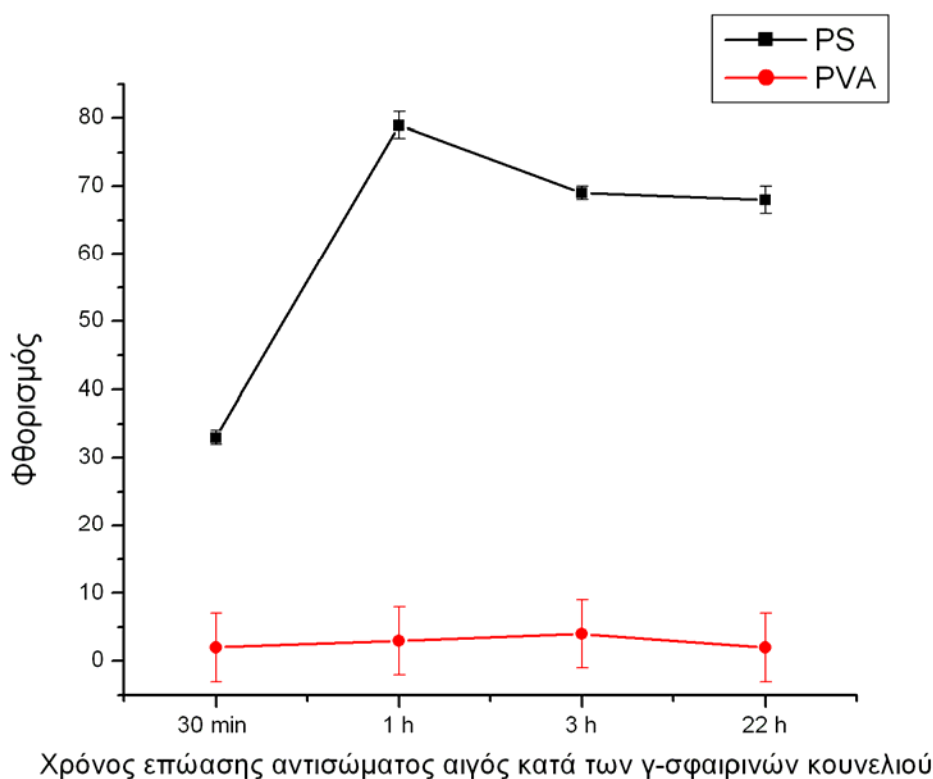
Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν οι περιοχές της διασταυρωμένης PVA στις σχηματισμένες επιφάνειες ανθίστανται στην προσρόφηση αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού μετά από μεγάλους χρόνους επώασης. Αναλυτικότερα οι λιθογραφημένες επιφάνειες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού επισημασμένου με Alexa Fluor 546 τελικής συγκέντρωσης 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για διαφορετικούς χρόνους επώασης 30 min, 1 h, 3 h και 22 h. Τα υμένια στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών ιόντων (carbonate buffer) συγκέντρωσης 0.05 M και pH 9.2 τρεις φορές και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και στέγνωσαν κάτω από ρεύμα  $\text{N}_2$  (Σχήμα 167).



**Σχήμα 167.** Στάδια για την επιλεκτική προσρόφηση αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού στις αποκεκαλυμμένες περιοχές από το υποκείμενο υπόστρωμα πολυστυρενίου και παράλληλη αποτροπή της φυσικής προσρόφησης στις δομές PVA.

Από το Σχήμα 168 παρατηρείται ότι, η επιλεκτική προσρόφηση του αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού στις περιοχές του πολυστυρενίου έναντι των περιοχών της διασταυρωμένης PVA είναι σταθερή και μετά από μεγάλους χρόνους επώασης των λιθογραφημένων επιφανειών. Επίσης δεν λαμβάνεται ανιχνεύσιμο σήμα από τις περιοχές της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης) ανεξάρτητα από το χρόνο επώασης. Επίσης, παρατηρείται ότι, η ικανότητα πρόσδεσης του πολυστυρενίου παίρνει την τελική της τιμή για το αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού μετά από 1h επώασης, όπου η σχετική ένταση φθορισμού από τις περιοχές του πολυστυρενίου ήταν 80 φορές πολλαπλάσια της

έντασης φθορισμού από τις περιοχές της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης). Για χρόνο επώασης 22 h η σχετική ένταση φθορισμού από τις περιοχές του πολυστυρενίου ήταν 68 φορές πολλαπλάσια της έντασης φθορισμού από τις περιοχές της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης).



**Σχήμα 168.** Σήματα φθορισμού για τα δύο υλικά: πολυστυρένιο (■) και PVA (●) για το αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού για διαφορετικούς χρόνους επώασης σχηματισμένων δομών διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της ικανότητας πρόσδεσης των υμενίων.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πολύ υψηλή εκλεκτικότητα ακινητοποίησης. Επίσης σε όλα τα πειράματα παρατηρείται ότι το σήμα φθορισμού από τις περιοχές της διασταυρωμένης PVA είναι σχεδόν μηδενικό δείχνοντας πλήρη αποτροπή της πρόσδεσης πρωτεϊνών.

#### 2.2.3.4. Υμένιο εποξειδικής ρητίνης

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα ανάπτυξης της προτεινόμενης διεργασίας που στηρίζεται στο φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA σε ένα δραστικό υπόστρωμα με στόχο να εφαρμοστεί σε περισσότερα υποστρώματα χωρίς να μεταβάλλει τις ιδιότητές τους (γωνίες επαφής και ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών). Γι' αυτή τη μελέτη επιλέχθηκε ως υπόστρωμα η εποξειδική ρητίνη, επειδή, οι εποξειδικές της ομάδες είναι πολύ δραστικές και αντιδρούν ακόμα και κάτω από ήπιες συνθήκες (βλέπε Κεφάλαιο Γ.1.2.3: η εποξειδική ρητίνη αντιδρά με τα παράγωγα της βιοτίνης ακόμα και σε pH 7). Επομένως, το φωτοευαίσθητο υμένιο PVA, το οποίο δεν θα επηρεάζει το υμένιο εποξειδικής ρητίνης (γωνίες επαφής και ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών) είναι πιθανόν να μπορεί να εφαρμοστεί σε περισσότερα υποστρώματα χωρίς να μεταβάλλει τις ιδιότητές τους.

#### 2.2.3.4.1. Μελέτη της επίδρασης του φωτοευαίσθητου υμενίου πολυ(βινυλικής αλκοόλης), χρησιμοποιώντας το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ως φωτοευαίσθητη ουσία στην εποξειδική ρητίνη

Αρχικά μελετήθηκε μέσω των γωνιών επαφής η επίδραση υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA) στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης. Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης παρασκευάστηκαν τρία δείγματα: 1) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο επιστρώθηκε (από διάλυμα 5% κ.β. εποξειδική ρητίνη μέσου μοριακού βάρους διαλυμένης σε PGMEA) στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου και πραγματοποιήθηκε θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min 2) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση υμενίου της σκέτης PVA (4.3% κ.β. PVA) στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88°C για 3 min (PEB) και εμφάνιση με απιονισμένο νερό 3) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA) στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v (Πίνακας 20).

Από τον Πίνακα 20 παρατηρείται ότι όταν η εμφάνιση του υμενίου της PVA γίνεται με απιονισμένο νερό τότε η γωνία επαφής του υποκείμενου υμενίου της εποξειδικής ρητίνης στο οποίο είχε επιστρωθεί το υμένιο της σκέτης PVA μειώνεται από τις 71° στις 56°, ενώ όταν η εμφάνιση γίνεται με διάλυμα μεθανόλης-νερού η γωνία επαφής μειώνεται από τις 71° στις 67°. Επομένως, επιλέχθηκε η εμφάνιση να γίνεται με διάλυμα μεθανόλης:νερού (1:1 v/v) προκειμένου να απομακρυνθεί αποτελεσματικότερα το υμένιο της σκέτης PVA από την εποξειδική ρητίνη.

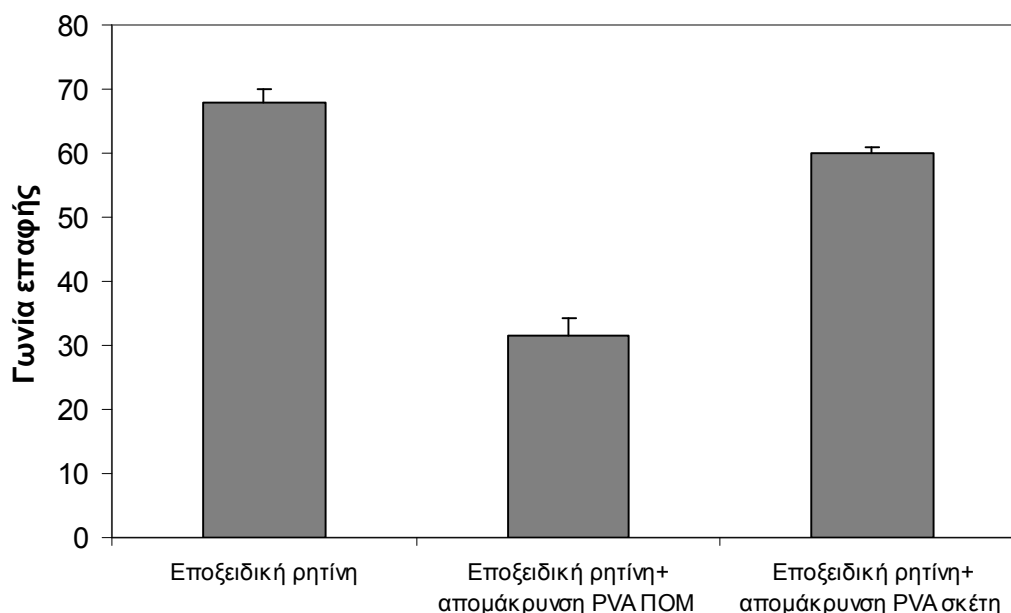
**Πίνακας 20.** Γωνίες επαφής υμενίων εποξειδικής ρητίνης μετά την απομάκρυνση υμενίου σκέτης PVA (4.3% κ.β. PVA) σε διαφορετικούς εμφανιστές

Υμένιο	Γωνίες επαφής
Εποξειδικής ρητίνης	71°
Εποξειδικής ρητίνης+ απομάκρυνση PVA σκέτη (εμφάνιση με απιονισμένο νερό)	56°
Εποξειδικής ρητίνης+ απομάκρυνση PVA σκέτη (εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού)	67°

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της λιθογραφικής διεργασίας φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης μέσω των γωνιών επαφής. Γι' αυτό το λόγο μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής του αρχικού υμενίου εποξειδικής ρητίνης και του υμενίου εποξειδικής ρητίνης που είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία υμενίων της PVA με την πραγματοποίηση του σταδίου της εμφάνισης με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν τρία δείγματα: 1) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο επιστρώθηκε (από διάλυμα 5% κ.β. εποξειδική ρητίνη μέσου μοριακού βάρους διαλυμένης σε PGMEA) στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου και πραγματοποιήθηκε θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min 2) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τη λιθογραφική διεργασία της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία (χωρίς την πραγματοποίηση του σταδίου της έκθεσης) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) (επίστρωση στις 4000 rpm

για 30 sec, θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB), την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min) 3) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί επίστρωση διαλύματος PVA (4.3% κ.β. PVA) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec), θέρμανση στους 70 °C για 1 min και στους 88 °C για 3 min και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v για 2 min (Σχήμα 169).

Από το Σχήμα 169 παρατηρείται ότι η γωνία επαφής του υμενίου της εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση, τη θέρμανση και την εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με το αρχικό υμένιο, δηλαδή το υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA είναι πολύ υδρόφιλο σε σχέση με το αρχικό. Επίσης παρατηρείται ότι η γωνία επαφής της εποξειδικής ρητίνης επηρεάζεται από την επίστρωση της PVA ακόμα και όταν το διάλυμα δεν περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ όπως είχε παρατηρηθεί και στο προηγούμενο πείραμα (Πίνακας 20), αλλά δεν επηρεάζεται τόσο πολύ όσο επηρεάζεται όταν το διάλυμα περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ.

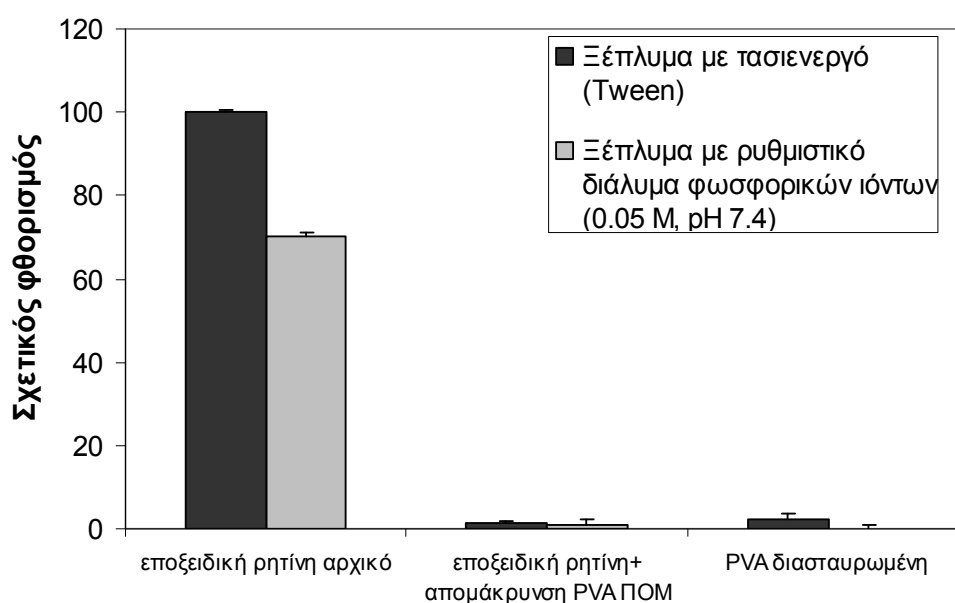


**Σχήμα 169.** Γωνίες επαφής υμενίων εποξειδικής ρητίνης προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση υμενίου της PVA και του φωτοευαίσθητου υμενίου της (4.3% PVA, 14.4% 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης. Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τη λιθογραφική διεργασία της PVA (Εποξειδική ρητίνη + απομάκρυνση PVA ΠΟΜ) και εποξειδική ρητίνη μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη + απομάκρυνση PVA σκέτη).

Ακολούθως, παρασκευάστηκαν έξι δείγματα: 1) Δύο υμένια εποξειδικής ρητίνης, τα οποία επιστρώθηκαν (συνθήκες επίστρωσης 4000 rpm για 1 min) σε δισκίο πυριτίου και θερμάνθηκαν στους 110°C για 3 min 2) Δύο υμένια εποξειδικής ρητίνης μετά τη λιθογραφική διεργασία της PVA, τα οποία παρασκευάστηκαν όπως το δείγμα 1 και είχαν επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB), την εμφάνιση με διάλυμα

μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min) 3) Δύο υμένια διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένια εποξειδικής ρητίνης (επίστρωση του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB), έκθεση στη λιθογραφική δόση 30 mJ/cm<sup>2</sup>, στους 88 °C για 3 min (PEB) και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min).

Στα δείγματα εναποτέθηκαν για 1 h σταγόνες από διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 μg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια, τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Κατόπιν, εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα, τα τρία δείγματα, ένα από κάθε κατηγορία, ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και τέλος ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>, ενώ τα υπόλοιπα τρία δείγματα, ένα από κάθε κατηγορία, ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων, το οποίο περιέχει 0.05% Tween και στη συνέχεια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>.



**Σχήμα 170.** Σχετικός φθορισμός υμενίων: εποξειδική ρητίνη αρχική, εποξειδική ρητίνη μετά τη λιθογραφική διεργασία της PVA και διασταυρωμένη PVA. Πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα των δειγμάτων είτε με τασιενεργό Tween-20 είτε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05 M, pH 7.4). Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546.

Από το Σχήμα 170 παρατηρείται ότι η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός προσροφάται σε ικανοποιητικό βαθμό στο αρχικό υμένιο της εποξειδικής ρητίνης, ενώ στο υμένιο εποξειδικής ρητίνης που έχει υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) η φυσική προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός είναι σχεδόν μηδενική. Αυτό αποδίδεται σε πιθανή αντίδραση

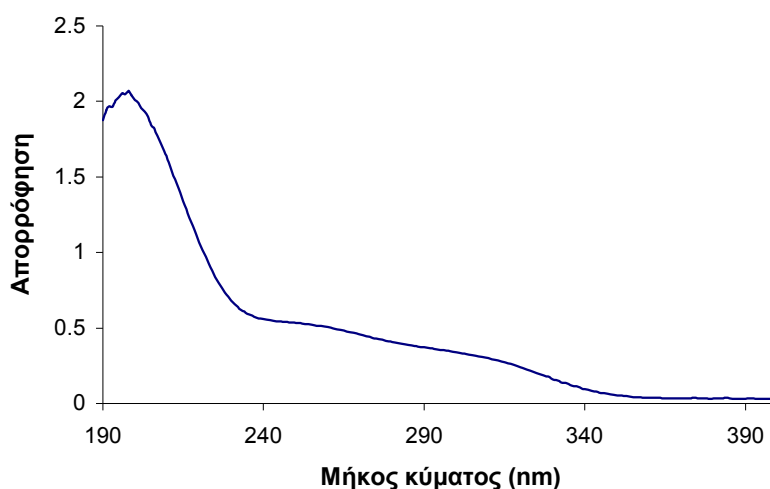
της εποξειδικής ρητίνης με την πολυ(βινυλική αλκοόλη), η οποία καταλύεται από το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με το προηγούμενο αποτέλεσμα, στο οποίο παρατηρήθηκε ότι η γωνία επαφής του υμενίου της εποξειδικής ρητίνης επηρεάζεται πολύ από τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA. Επίσης, παρατηρείται ότι στη διασταυρωμένη πολυ(βινυλική αλκοόλη) δεν προσροφώνται οι πρωτεΐνες, όπως ήταν αναμενόμενο και είχε αποδειχτεί και σε προηγούμενα πειράματα. Τα σήματα φθορισμού στα υμένια που έχουν ξεπλυθεί με τασιενεργό διάλυμα Tween είναι μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά που δεν έχουν ξεπλυθεί με Tween καθώς είναι γνωστό ότι ο φθορισμός ενισχύεται από τα υπολείμματα του Tween στο υμένιο.

Επομένως για να βελτιστοποιηθεί η προτεινόμενη διεργασία που στηρίζεται στο φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA με στόχο να εφαρμοστεί σε περισσότερα υποστρώματα χωρίς να μεταβάλλει τις ιδιότητές τους είναι απαραίτητο να αντικατασταθεί το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ με μία ουσία που θα προκαλεί τη διασταύρωση της PVA ενώ παράλληλα η παρουσία της στο αρχικό φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA δεν θα μεταβάλλει τις ιδιότητες (γωνία επαφής και ικανότητα προσρόφησης) των υποκείμενων υποστρωμάτων.

#### 2.2.3.4.2. Μελέτη της επίδρασης του φωτοευαίσθητου υμενίου πολυ(βινυλικής αλκοόλης) χρησιμοποιώντας το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ως φωτοευαίσθητη ουσία

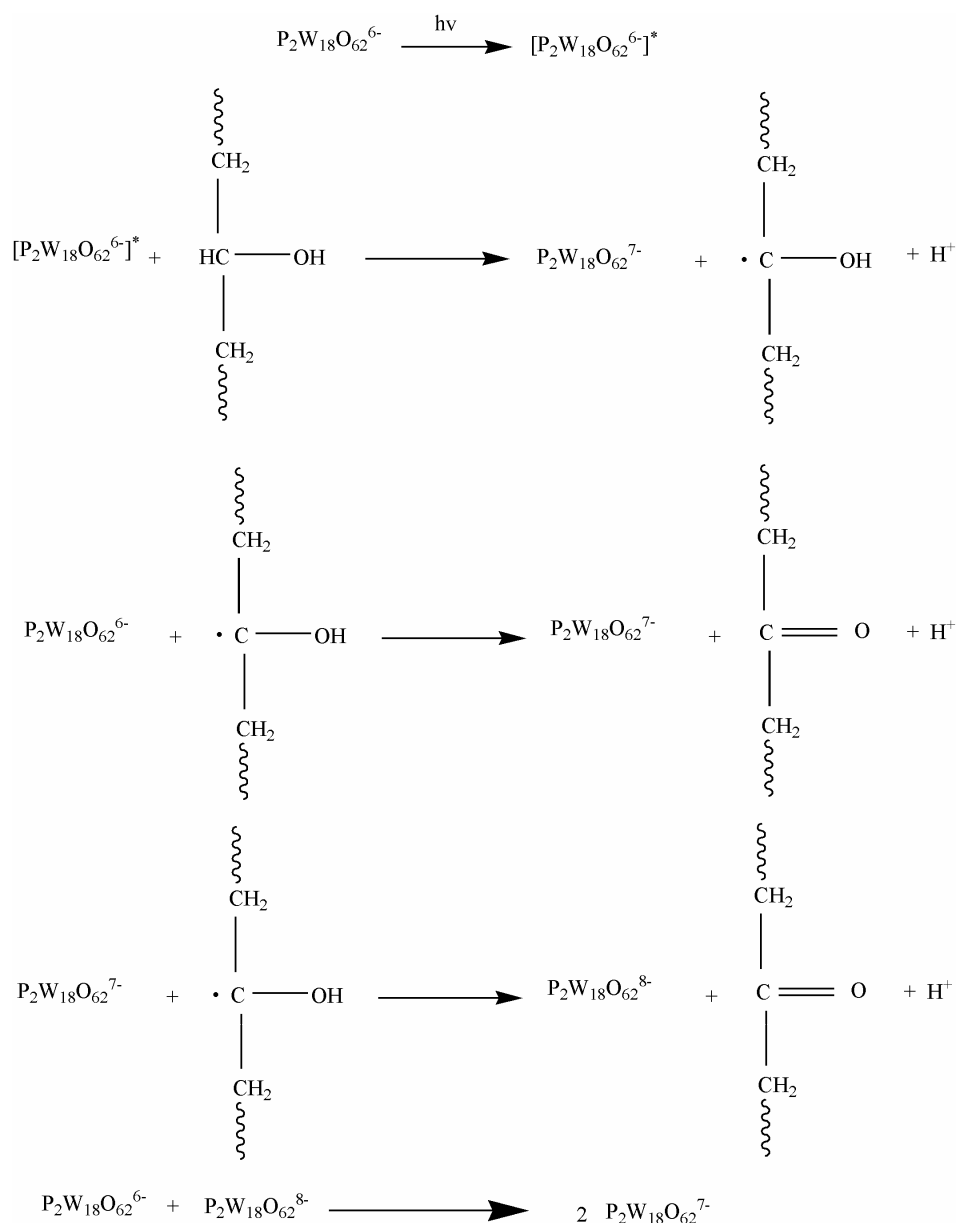
Επειδή το υμένιο της εποξειδικής ρητίνης (από διάλυμα 5% κ.β. εποξειδική ρητίνη μέσου μοριακού βάρους διαλυμένης σε PGMEA) επηρεαζόταν πολύ από το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) χρησιμοποιήθηκε μία άλλη πολυοξομεταλλική ένωση, το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ( $(NH_4)_6(P_2W_{18}O_{62})$ ) προκειμένου να επιτευχθεί η διασταύρωση της PVA χωρίς να επηρεάζεται το υπόστρωμα από τη λιθογραφική διεργασία. Το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο παρασκευάστηκε από τον Δρ. Α. Δούβα.

Το φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (διάλυμα 4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο σε απιονισμένο νερό), το οποίο επιστρώθηκε στις 4000 rpm για 30 sec και πραγματοποιήθηκε θέρμανση (PAB) στους 70 °C για 1 min παρατίθεται στο Σχήμα 171.



Σχήμα 171. Φάσμα απορρόφησης υμενίου που παρασκευάστηκε από διάλυμα σύστασης 4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο σε απιονισμένο νερό.

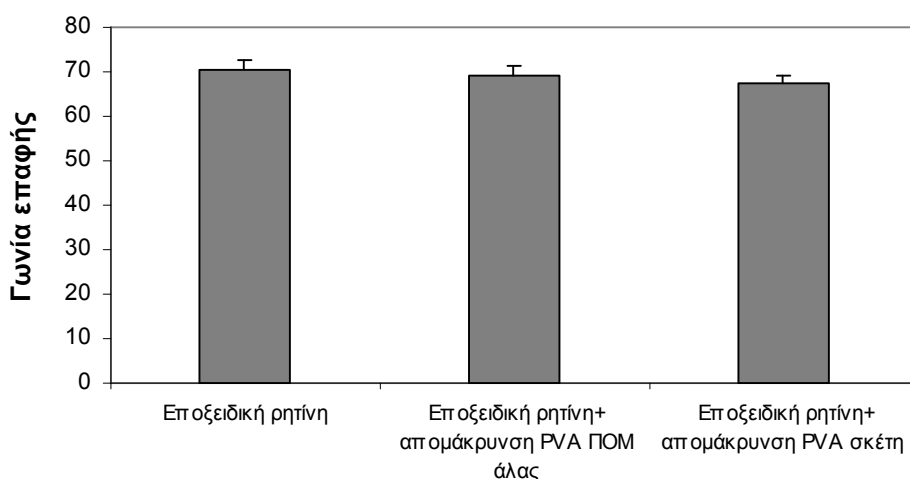
Η διασταύρωση της PVA είναι δυνατό να επιτευχθεί με τη χρήση του 18-βολφραμοδιφωσφορικού αμμωνίου. Αναλυτικότερα, αρχικά, με έκθεση σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος προκαλείται η φωτοδιέγερση του 18-βολφραμοδιφωσφορικού ανιόντος  $P_2W_{18}O_{62}^{6-}$ . Στη συνέχεια το διεγερμένο ανιόν  $[P_2W_{18}O_{62}^{6-}]^*$  ανάγεται προς  $P_2W_{18}O_{62}^{7-}$  και  $P_2W_{18}O_{62}^{8-}$ , ενώ ταυτόχρονα οξειδώνονται οι υδροξυλομάδες ( $-OH$ ) της PVA προς καρβονυλομάδες (Σχήμα 172) [151, 152]. Και σε αυτή τη διεργασία το διεγερμένο ανιόν  $[P_2W_{18}O_{62}^{6-}]^*$  μπορεί να αποδιεγερθεί είτε απελευθερώνοντας θερμότητα είτε εκπέμποντας ακτινοβολία και να μην οδηγήσει σε οξείδωση της PVA. Στη συνέχεια, σε υψηλές θερμοκρασίες και λόγω της παρουσίας των καρβονυλίων λαμβάνει χώρα η διασταύρωση της PVA μέσω αφυδάτωσης και αντιδράσεων κυκλοπροσθήκης Diels-Alder, που παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 48 [155].



**Σχήμα 172.** Φωτοαναγωγή του 18-βολφραμοδιφωσφορικού ανιόντος και οξείδωση της PVA με αποτέλεσμα το σχηματισμό καρβονυλομάδων.



Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης μέσω των γωνιών επαφής. Η εμφάνιση επιλέχτηκε να γίνει με διάλυμα μεθανόλης-νερού 1:1 v/v προκειμένου να απομακρυνθεί αποτελεσματικότερα το υμένιο της PVA από το υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης (βλέπε Πίνακα 20). Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης παρασκευάστηκαν τρία δείγματα (Σχήμα 173): 1) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο επιστρώθηκε (από διάλυμα 5% κ.β. εποξειδικής ρητίνης μέσου μοριακού βάρους διαλυμένης σε PGMEA) στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου και πραγματοποιήθηκε θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min. 2) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 90 °C για 4 min (PAB και PEB), την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 3) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί επίστρωση διαλύματος PVA (4.3% κ.β. PVA) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec), θέρμανση στους 90 °C για 4 min (PAB και PEB) και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min.



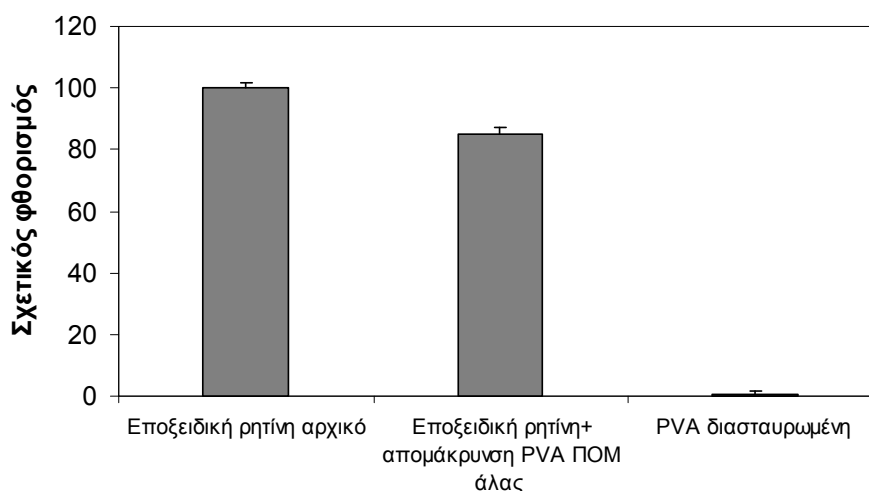
**Σχήμα 173.** Γωνίες επαφής υμενίων εποξειδικής ρητίνης αρχικής (Εποξειδική ρητίνη), εποξειδικής ρητίνης που είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (Εποξειδική ρητίνης + απομάκρυνση PVA POM άλας) και εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνης + απομάκρυνση PVA σκέτη).

Από το Σχήμα 173 παρατηρείται ότι η γωνία επαφής του υμενίου της εποξειδικής ρητίνης, μετά τη λιθογραφική διεργασία (επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) που περιέχει το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ως φωτοευαίσθητη ουσία επηρεάζεται λιγότερο σε σχέση με το υμένιο της εποξειδικής ρητίνης, μετά τη λιθογραφική διεργασία (επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ως φωτοευαίσθητη ουσία (Σχήμα 169). Η γωνία επαφής του υμενίου της εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) είναι

σχεδόν ίση με τη γωνία επαφής του υμενίου της εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση του υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA).

Στη συνέχεια για να μελετηθεί η επίδραση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, που περιέχει το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ως φωτοευαίσθητη ουσία, στην ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών του υποκείμενου υμενίου εποξειδικής ρητίνης παρασκευάστηκαν τρία δείγματα: 1) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο επιστρώθηκε (συνθήκες επίστρωσης 4000 rpm για 1 min) σε δισκίο πυριτίου και θερμάνθηκε στους 110 °C για 3 min. 2) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τη λιθογραφική διεργασία της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 90 °C για 4 min (PAB και PEB), την εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 3) Δείγμα διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης (επίστρωση του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 90 °C για 1 min (PAB), έκθεση στη λιθογραφική δόση 167 mJ/cm<sup>2</sup>, θέρμανση στους 90 °C για 3 min (PEB) και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min).

Στα δείγματα εναποτέθηκαν για 1 h σταγόνες από διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 μg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Στη συνέχεια εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο περιέχει 0.05% Tween και στη συνέχεια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub> (Σχήμα 174).



**Σχήμα 174.** Σχετικός φθορισμός υμενίων εποξειδικής ρητίνης αρχικής, εποξειδικής ρητίνης που είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (Εποξειδική ρητίνη + απομάκρυνση PVA ΠΟΜ άλας) και δείγμα διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης. Η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός ανιχνεύτηκε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546.

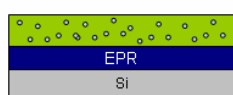
Από το Σχήμα 174 παρατηρείται ότι η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός προσροφάται σε ικανοποιητικό βαθμό στο αρχικό υμένιο της εποξειδικής ρητίνης και στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης που έχει υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο). Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με το προηγούμενο αποτέλεσμα, στο οποίο παρατηρήθηκε ότι η γωνία επαφής του υμενίου της εποξειδικής ρητίνης δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο). Επίσης παρατηρείται ότι στη διασταυρωμένη πολυ(βινυλική αλκοόλη) δεν προσροφώνται οι πρωτεΐνες, όπως ήταν αναμενόμενο και είχε αποδειχτεί και σε προηγούμενα πειράματα (Κεφάλαιο Γ.2.2.3.3).

Επομένως, επετεύχθηκε ο σκοπός αυτής της μελέτης προκειμένου να βρεθεί φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA που μπορεί να εφαρμοστεί σε περισσότερα υποστρώματα χωρίς να μεταβάλλει τις ιδιότητές τους (γωνία επαφής και ικανότητα προσρόφησης).

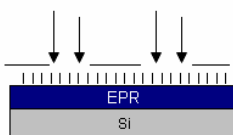
#### 2.2.3.4.3. Εμβολισμός αλυσίδων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης πρωτεϊνών

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι ο εμβολισμός αλυσίδων πολυ(βινυλικής αλκοόλης) σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης για την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης και την επιλεκτική πρόσδεση πρωτεϊνών.

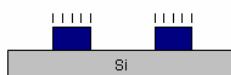
Από το πείραμα που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 170 συμπεραίνεται ότι αλυσίδες PVA εμβολίζονται στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η πρόσδεση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Χρησιμοποιώντας αυτή τη διαδικασία θα μπορούσε να κατασκευαστεί σχηματοποιημένη επιφάνεια (Σχήμα 175) που θα απέτρεπε την προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός λόγω της δυνατότητας που έχει η εποξειδική ρητίνη να σχηματοποιείται μέσω φωτολιθογραφίας με την προσθήκη φωτοπαραγωγού οξέος στην πολυμερική της μήτρα ή μέσω λιθογραφίας με δέσμη ηλεκτρονίων.



1. Επίστρωση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% PVA, 14.4% 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) Η επίστρωση γίνεται πάνω σε φωτοευαίσθητο υμένιο εποξειδικής ρητίνης (EPR). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται θέρμανση στους 88 °C για 4min και τέλος πραγματοποιείται εμφάνιση για 2 min.



2. Έκθεση, θέρμανση (PEB) και εμφάνιση για τη σχηματοποίηση της εποξειδικής ρητίνης, στην οποία έχουν εμβολιστεί αλυσίδες PVA.

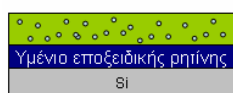


3. Σχηματοποιημένη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη (EPR), η οποία αποτρέπει την προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός

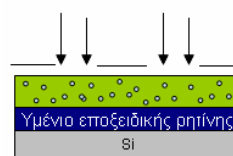
**Σχήμα 175.** Εμβολισμός αλυσίδων PVA σε φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη (EPR) χρησιμοποιώντας το φωτοευαίσθητο υμένιο PVA (4.3% PVA, 14.4% 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) έτσι ώστε να αποτρέπεται η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στις επιθυμητές περιοχές.

Στη διεργασία που παρουσιάζεται στο Σχήμα 175 σχηματοποιείται μέσω φωτολιθογραφίας ένα υμένιο που αποτρέπει την προσρόφηση πρωτεϊνών. Προκειμένου να επιτευχθεί ο εμβολισμός αλυσίδων PVA σε συγκεκριμένες περιοχές ακολουθήθηκε η εναλλακτική μεθοδολογία που παρουσιάζεται στο Σχήμα 176.

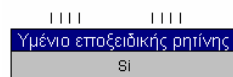
Αναλυτικότερα, κατά τη διάρκεια της Διδακτορικής Διατριβής έγινε προσπάθεια να εμβολιστούν αλυσίδες PVA σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο δεν περιέχει το φωτοπαραγωγό οξύς TPS, χρησιμοποιώντας το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA που περιέχει το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ως φωτοευαίσθητη ουσία. Στο Κεφάλαιο Γ.2.2.3.4.2. παρουσιάστηκε ότι οι ανέκθετες περιοχές δεν επηρεάζονται από την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) επομένως οι περιοχές αυτές θα αποτελέσουν τις περιοχές, στις οποίες θα προσροφάται η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός. Η προτεινόμενη διεργασία παρουσιάζεται στο Σχήμα 176.



1. Επίστρωση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% PVA, 13% 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) Η επίστρωση γίνεται πάνω σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται θέρμανση στους 88 °C για 4min και τέλος πραγματοποιείται εμφάνιση για 2 min.



2. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται έκθεση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% PVA, 13% 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) και εμφάνιση.



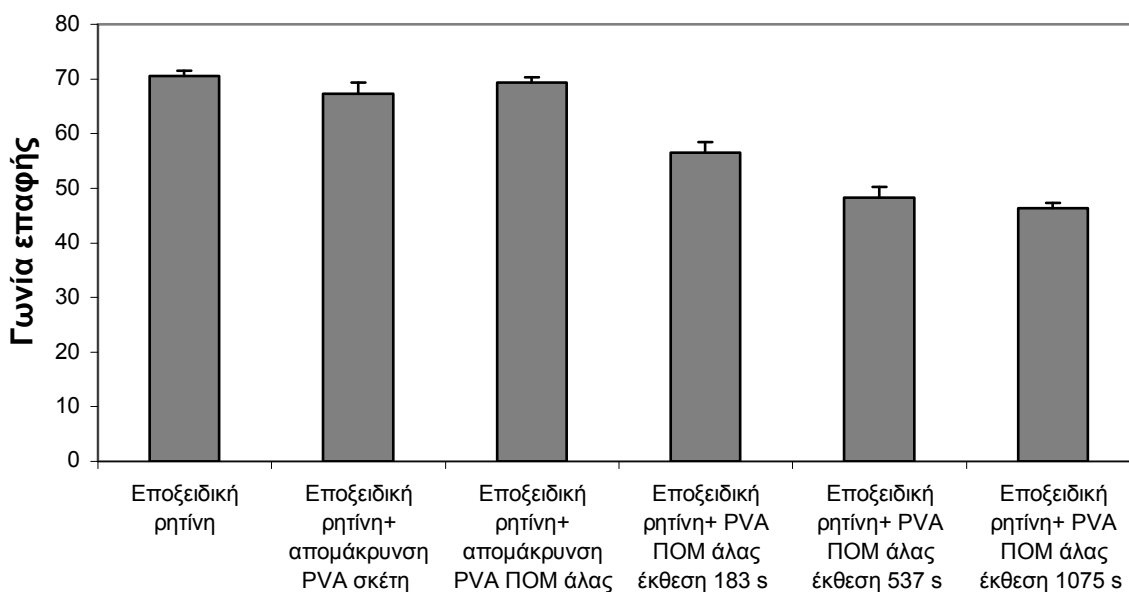
3. Υμένιο εποξειδικής ρητίνης τροποποιημένο τοπικά από εμβολισμένες αλυσίδες PVA

**Σχήμα 176.** Εμβολισμός αλυσίδων PVA σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης χρησιμοποιώντας το φωτοευαίσθητο υμένιο PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) έτσι ώστε να αποτρέπει η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός στις επιθυμητές περιοχές.

Προκειμένου να εμβολιστούν αλυσίδες PVA στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης και να αποφευχθεί η διασταύρωση της, θα εφαρμοστούν είτε μεγάλες δόσεις έκθεσης είτε μεγάλες δόσεις έκθεσης και θέρμανση (PEB) σε χαμηλότερη θερμοκρασία από αυτήν που είναι απαραίτητη για τη διασταύρωση της PVA (PEB 90 °C, Σχήμα 174) χρησιμοποιώντας το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA το οποίο περιέχει το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο (ΠΟΜ άλας) ως φωτοευαίσθητη ουσία.

Γι' αυτή τη μελέτη παρασκευάστηκαν έξι δείγματα στα οποία μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής: 1) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο επιστρώθηκε (από διάλυμα 5% εποξειδική ρητίνη μέσου μοριακού βάρους διαλυμένης σε PGMEA) στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου και πραγματοποιήθηκε θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min. 2) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί επίστρωση διαλύματος PVA (4.3% κ.β. PVA) στις 4000 rpm για 30 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min. 3) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13%

κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 4) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τον εμβολισμό αλυσίδων PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμο-διφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, χρόνος έκθεσης 183 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 5) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τον εμβολισμό αλυσίδων PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμο-διφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, χρόνος έκθεση 537 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 6) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τον εμβολισμό αλυσίδων PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμο-διφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, χρόνος έκθεση 1075 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). Το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο αναφέρεται ως POM άλας στο Σχήμα 177.



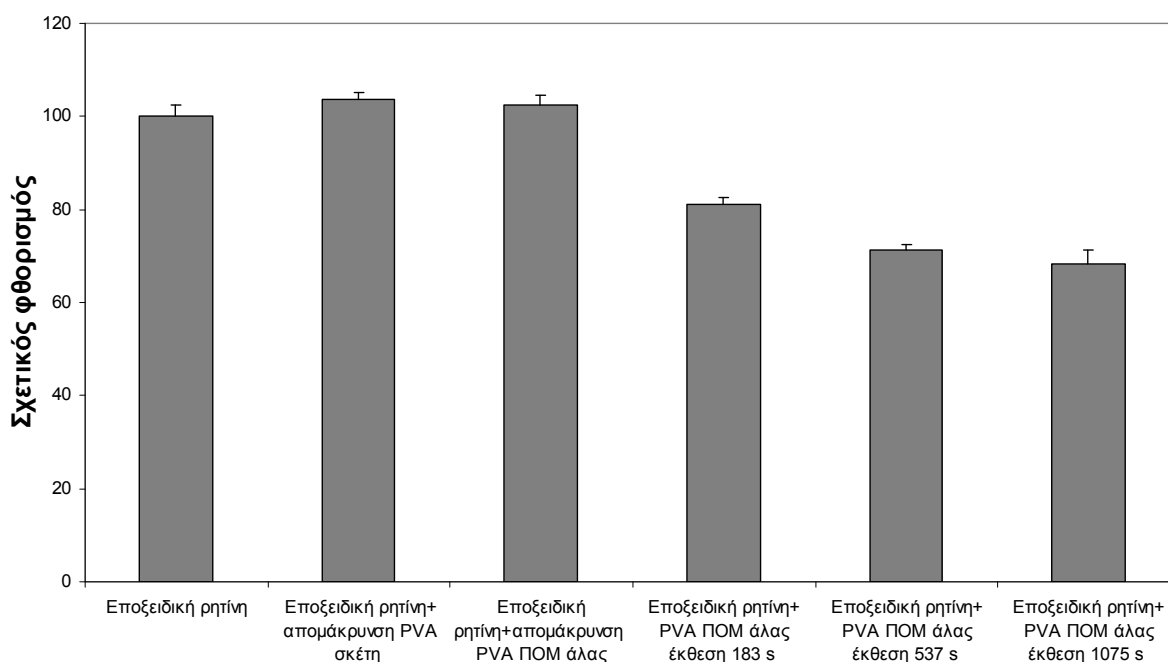
**Σχήμα 177.** Γωνίες επαφής της αρχικής εποξειδικής ρητίνης σε σχέση με δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν υποστεί την επίστρωση και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA POM άλας) και σε σχέση με δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA (Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 183 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 537 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 1075 s).

Από το Σχήμα 177 παρατηρείται ότι η γωνία επαφής των υμενίων της εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση και την εμφάνιση του υμενίου της PVA και του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) δεν μεταβάλλονται. Οι γωνίες επαφής των υμενίων της εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση, έκθεση και εμφάνιση των φωτοευαίσθητων υμενίων της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) είναι μικρότερες σε σχέση με την αρχική

εποξειδική ρητίνη αποδεικνύοντας ότι οι επιφάνειες είναι πιο υδρόφιλες λόγω του εμβολισμού αλυσίδων PVA πάνω στην εποξειδική ρητίνη.

Στα ίδια δείγματα μετρήθηκε το πάχος των υμενίων. Τα δείγματα δεν διαφέρανε στο πάχος. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς έχουν εμβολιστεί αλυσίδες PVA και δεν έχει διασταυρωθεί το υμένιο PVA για να αποκτήσει κάποιο πάχος.

Επίσης τα ίδια δείγματα μελετήθηκαν ως προς την προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Στα δείγματα εναποτέθηκαν για 1 h σταγόνες διαμέτρου ~ 2 mm από διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$ . Στη συνέχεια εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο περιέχει 0.05% Tween και τέλος ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα  $\text{N}_2$  (Σχήμα 178).



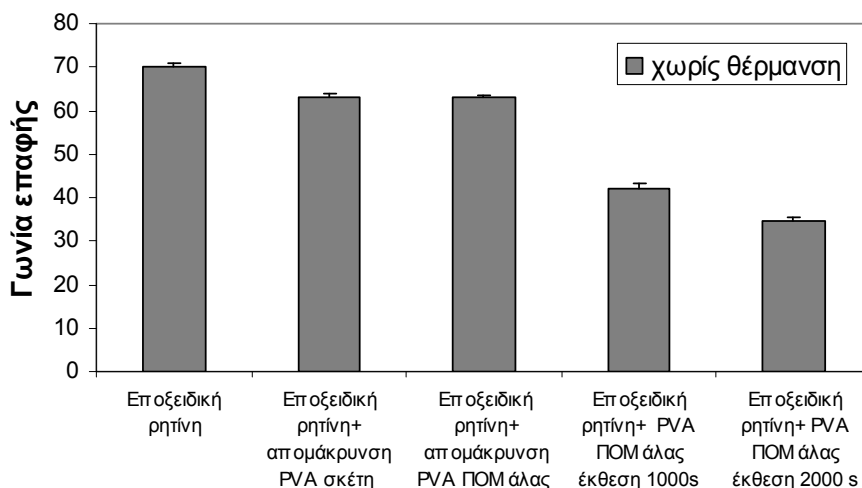
**Σχήμα 178.** Σχετικός φθορισμός της αρχικής εποξειδικής ρητίνης σε σχέση με δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν υποστεί την επίστρωση και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη + απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA POM άλας) και σε σχέση με δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA (Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 183 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 537 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 1075 s).

Από το Σχήμα 178 παρατηρείται ότι τα δείγματα έχουν πλήρη αντιστοιχία με τις γωνίες επαφής, δηλαδή τα δείγματα που έχουν μικρότερες γωνίες επαφής παρουσιάζουν και μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Συμπερασματικά παρατηρείται ότι στα δείγματα της εποξειδικής ρητίνης στην οποία είχαν προσδεθεί αλυσίδες πολυ(βινυλικής αλκοόλης) εμφανίζουν

μειωμένη ικανότητα προσρόφησης της πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Όμως από το προηγούμενο σχήμα συμπεραίνεται ότι ο εμβολισμός των αλυσίδων της PVA δεν ήταν αποτελεσματικός ως προς την αποτροπή της προσρόφησης των πρωτεϊνών. Επειδή ο στόχος είναι να εξαλειφθεί εντελώς η προσρόφηση της πρωτεΐνης γι' αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα, στα οποία παρασκευάστηκαν δείγματα με μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης ή δείγματα στα οποία η λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) περιελάμβανε θέρμανση σε χαμηλότερη θερμοκρασία από αυτήν που απαιτείται για τη διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PEB 90 °C, Σχήμα 174).

Στο επόμενο πείραμα εφαρμόστηκαν μεγαλύτερες δόσεις έκθεσης προκειμένου να εμβολιστούν περισσότερες αλυσίδες PVA. Παρασκευάστηκαν πέντε δείγματα στα οποία μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής: 1) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο επιστρώθηκε (από διάλυμα 5% εποξειδική ρητίνη μέσου μοριακού βάρους διαλυμένης σε PGMEA) στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου και πραγματοποιήθηκε θέρμανση PAB στους 110 °C για 3 min. 2) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί επίστρωση και εμφάνιση διαλύματος PVA (4.3% κ.β. PVA) στις 4000 rpm για 30 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min. 3) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση, και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί επίστρωση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 4) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τον εμβολισμό αλυσίδων PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί την επίστρωση, έκθεση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, χρόνος έκθεσης 1000 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 5) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τον εμβολισμό αλυσίδων PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί την επίστρωση, έκθεση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, χρόνος έκθεσης 2000 sec και εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min) (Σχήμα 179).

Από το Σχήμα 179 παρατηρείται ότι οι γωνίες επαφής των υμενίων της εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση, έκθεση και την εμφάνιση των φωτοευαίσθητων υμενίων της PVA είναι μικρότερες σε σχέση με το αρχικό υμένιο εποξειδικής ρητίνης αποδεικνύοντας ότι έχουν εμβολιστεί αλυσίδες PVA πάνω στην εποξειδική ρητίνη όπως παρατηρείται και στο Σχήμα 180. Η γωνία επαφής του υμενίου εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, έκθεση 2000 sec και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) είναι μικρότερη σε σχέση με τη γωνία επαφής του υμενίου εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, έκθεση 1000 sec και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% PVA, 13% 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) αποδεικνύοντας ότι έχουν εμβολιστεί περισσότερες αλυσίδες PVA στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης.

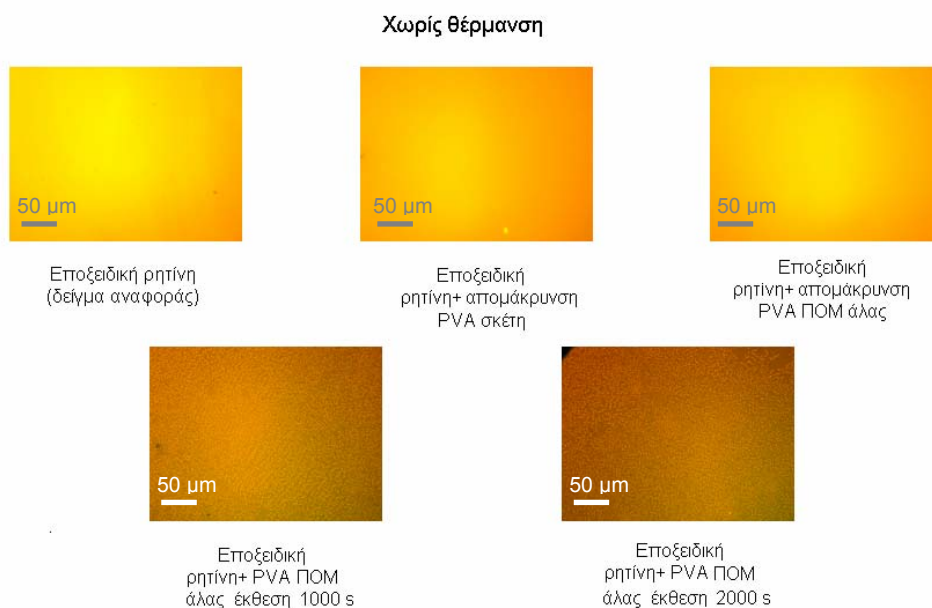


**Σχήμα 179.** Γωνίες επαφής της αρχικής εποξειδικής ρητίνης σε σχέση με δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν υποστεί την επίστρωση και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA POM άλας) και σε σχέση με δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA (Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 1000 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 2000 s).

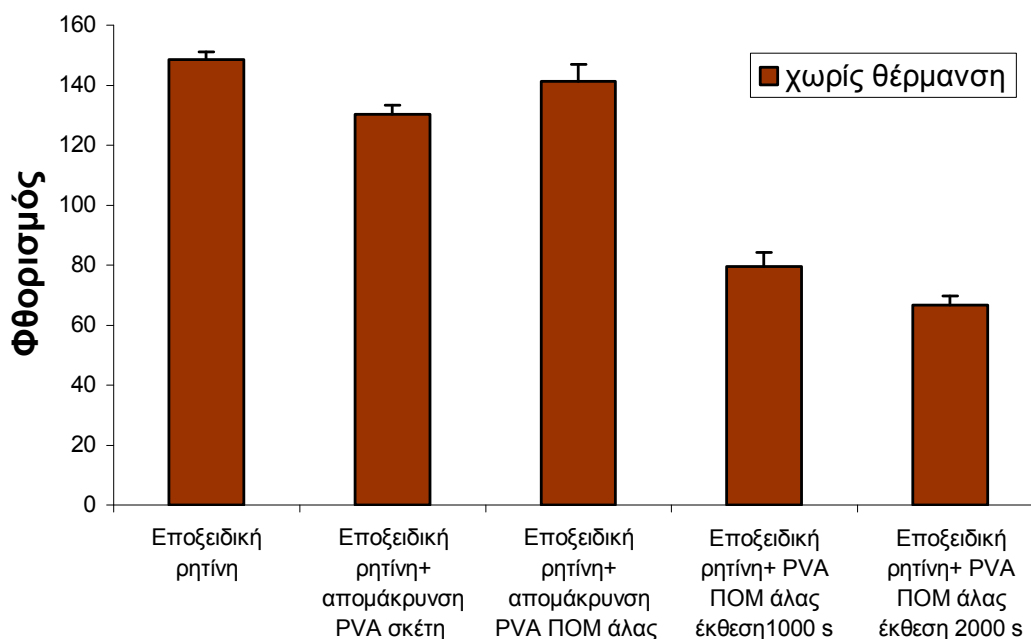
Στη συνέχεια στα ίδια δείγματα μελετήθηκε η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Αναλυτικότερα στα δείγματα εναποτέθηκαν για 1 h σταγόνες διαμέτρου ~ 2 mm από διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 µg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 µL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο περιέχει 0.05% Tween και στη συνέχεια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Στη συνέχεια τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού. Εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 180 και οι μετρήσεις παρατίθενται στο Σχήμα 181.

Από το Σχήμα 181 παρατηρείται ότι τα δείγματα έχουν πλήρη αντιστοιχία με τις γωνίες επαφής, δηλαδή τα δείγματα που έχουν μικρότερες γωνίες επαφής παρουσιάζουν και μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Συμπερασματικά παρατηρείται ότι τα δείγματα της εποξειδικής ρητίνης στα οποία είχαν προσδεθεί αλυσίδες πολυ(βινυλικής αλκοόλης) εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα προσρόφησης της πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς. Όμως από τα Σχήματα 180 και 181 συμπεραίνεται ότι παρά τον εμβολισμό αλυσίδων της PVA δεν αποτράπηκε η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Η διάσταση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός είναι παρεμφερής με τη διάσταση της οροαλβουμίνης βοός που έχει υπολογιστεί ότι είναι 14\*4\*4 nm<sup>3</sup> [234] και είναι πιθανόν η προσρόφησης της να μην παρεμποδίζεται από τις εμβολισμένες αλυσίδες PVA με τελικό αποτέλεσμα να προσροφάται στην υποκείμενη επιφάνεια της εποξειδικής ρητίνης.





**Σχήμα 180.** Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού για τη βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός που είχε προσροφηθεί σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης, σε δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν υποστεί την επίστρωση και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA POM άλας) και σε δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA (Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 1000 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 2000 s). Η ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός έγινε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546.

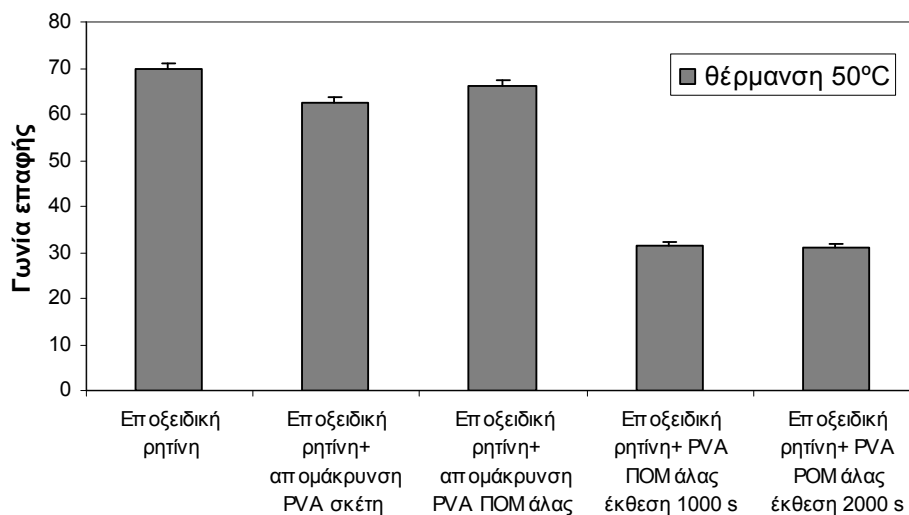


**Σχήμα 181.** Φθορισμός για τη βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός που είχε προσροφηθεί σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης και σε δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν υποστεί την επίστρωση και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA POM άλας) και σε δείγματα που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA (Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 1000 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 2000 s). Η ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός έγινε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546.

Επειδή ο στόχος είναι να εξαλειφθεί πλήρως η προσρόφιση της πρωτεΐνης γι' αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα, στα οποία παρασκευάστηκαν δείγματα στα οποία μετά την έκθεση εφαρμόστηκε θέρμανση σε χαμηλότερη θερμοκρασία από αυτήν που απαιτείται για τη διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PEB 90 °C, Σχήμα 174).

Έτσι, εφαρμόστηκαν πιο έντονες συνθήκες (θέρμανση μετά την έκθεση) προκειμένου να εμβολιστούν περισσότερες αλυσίδες PVA στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης. Αρχικά παρασκευάστηκαν πέντε δείγματα στα οποία μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής. Τα πέντε δείγματα παρασκευάστηκαν ως εξής: 1) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης, το οποίο επιστρώθηκε (από διάλυμα 5% κ.β. εποξειδική ρητίνη μέσου μοριακού βάρους διαλυμένης σε PGMEA) στις 4000 rpm για 1 min σε δισκίο πυριτίου και πραγματοποιήθηκε θέρμανση PAB στους 110°C για 3 min. 2) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C για 4 min και εμφάνιση της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί επίστρωση διαλύματος σκέτης PVA (4.3% κ.β. PVA) στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 50 °C για 4 min και εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min. 3) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C για 4 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 50 °C για 4 min (PAB και PEB) και εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 4) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τον εμβολισμό αλυσίδων PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί την επίστρωση, θέρμανση, έκθεση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 50 °C για 1 min (PAB), χρόνος έκθεσης 1000 sec, θέρμανση στους 50 °C για 3 min (PEB) και εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min). 5) Υμένιο εποξειδικής ρητίνης μετά τον εμβολισμό αλυσίδων PVA, το οποίο παρασκευάστηκε όπως το δείγμα 1 και είχε επιπλέον υποστεί την επίστρωση, θέρμανση, έκθεση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) (επίστρωση στις 4000 rpm για 30 sec, θέρμανση στους 50 °C για 1 min (PAB), χρόνος έκθεσης 2000 sec, θέρμανση στους 50 °C για 3 min (PEB) και εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού 1:1 v/v για 2 min) (Σχήμα 182).

Από το Σχήμα 182 παρατηρείται ότι η γωνία επαφής των υμενίων της εποξειδικής ρητίνης οι γωνίες επαφής των υμενίων της εποξειδικής ρητίνης, μετά την επίστρωση, θέρμανση, έκθεση, θέρμανση και την εμφάνιση των φωτοευαίσθητων υμενίων της PVA είναι μικρότερες σε σχέση με το αρχικό αποδεικνύοντας ότι έχουν εμβολιστεί αλυσίδες PVA πάνω στην εποξειδική ρητίνη όπως παρατηρήθηκε και στο Σχήμα 179. Η γωνία επαφής του υμενίου εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση, έκθεση 2000 sec, θέρμανση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) είναι ίδια σε σχέση με τη γωνία επαφής του υμενίου εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση, έκθεση 1000 sec, θέρμανση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 13% κ.β. 18-βόλφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο) αποδεικνύοντας ότι υπάρχει ένας κορεσμός στις αλυσίδες PVA που μπορούν να εμβολιστούν στο υποκείμενο υμένιο εποξειδικής ρητίνης.

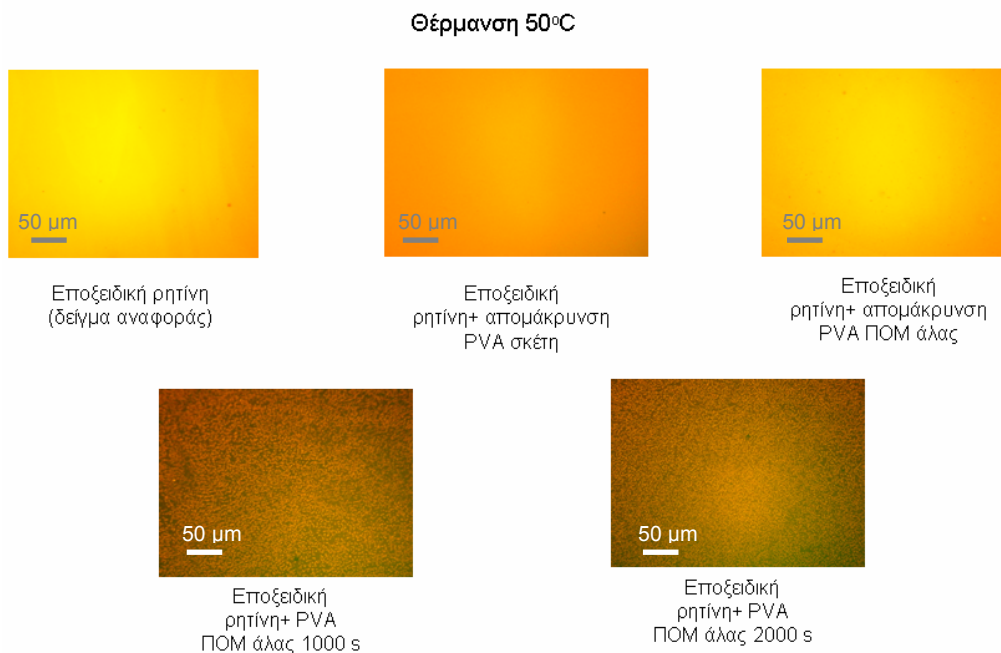


**Σχήμα 182.** Γωνίες επαφής της αρχικής εποξειδικής ρητίνης και δειγμάτων εποξειδικής ρητίνης μετά από επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA ΠΟΜ άλας) και δειγμάτων εποξειδικής ρητίνης που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA μετά από επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C, έκθεση, θέρμανση στους 50 °C και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ PVA ΠΟΜ άλας έκθεση 1000 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA ΠΟΜ άλας έκθεση 2000 s).

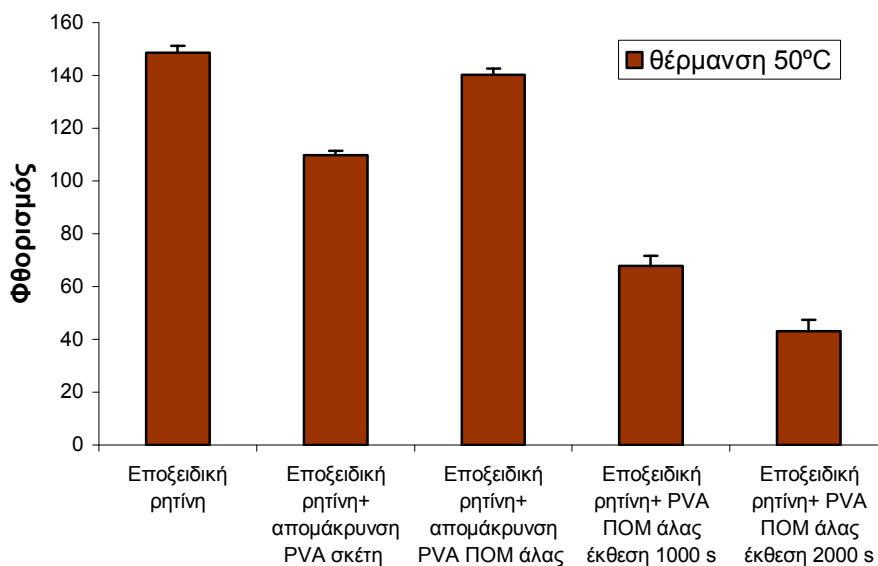
Επίσης από το Σχήμα 182 προκύπτει ότι τα δείγματα αυτά αναμένεται να έχουν και τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την αποτροπή της φυσικής προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Στα ίδια δείγματα μελετήθηκε η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός.

Για το σκοπό αυτό στα δείγματα εναποτέθηκαν για 1 h σταγόνες από διάλυμα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 25 μg/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Στη συνέχεια τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οροαλβουμίνης βοός συγκέντρωσης 10 g/L διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 0.05M, pH 7.4. Μετά από 1 h τα δείγματα ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (0.05M, pH 7.4) και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Εμβαπτίζονται για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης συγκέντρωσης 5 μL/mL επισημασμένης με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 διαλυμένης στο διάλυμα οροαλβουμίνης βοός 10 g/L. Έπειτα τα δείγματα ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο περιέχει 0.05% Tween και στη συνέχεια ξεπλένονται και εμβαπτίζονται 3 φορές σε απιονισμένο νερό και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>. Στη συνέχεια τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 183.

Στο Σχήμα 184 παρατηρείται ότι τα δείγματα έχουν πλήρη αντιστοιχία με τις γωνίες επαφής, δηλαδή τα δείγματα που έχουν μικρότερες γωνίες επαφής παρουσιάζουν και μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός ήταν λιγότερη σε σχέση με τα δείγματα που δεν είχαν υποστεί θέρμανση (Σχήμα 181), αλλά και πάλι ο εμβολισμός των αλυσίδων της PVA δεν ήταν αποτελεσματικός ως προς την αποτροπή της προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Επομένως, και σε αυτήν την περίπτωση η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός δεν παρεμποδιζόταν ιδιαίτερα από τις εμβολισμένες αλυσίδες PVA.



**Σχήμα 183.** Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού για τη βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός που είχε προσροφηθεί σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης (δείγμα αναφοράς) και σε δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν υποστεί την επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA POM άλας) και σε δείγματα που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA (Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 1000 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 2000 s). Η ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός έγινε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546.

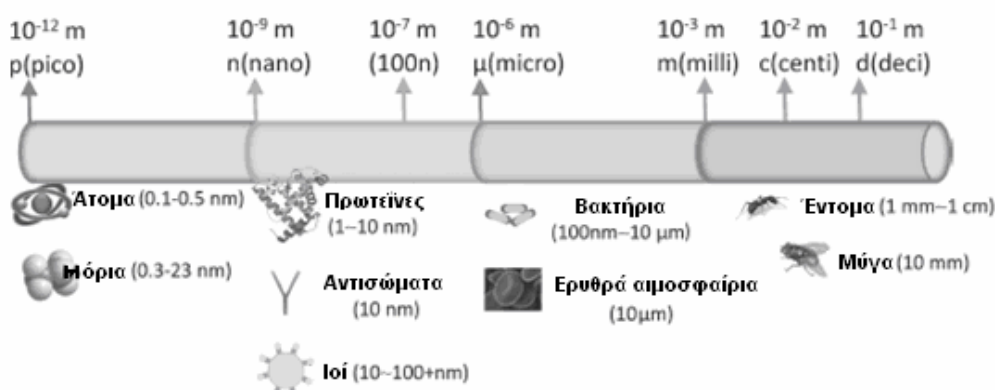


**Σχήμα 184.** Φθορισμός για τη βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός που είχε προσροφηθεί σε υμένιο εποξειδικής ρητίνης, σε δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν υποστεί την επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C και εμφάνιση υμενίου σκέτης PVA (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA σκέτη), επίστρωση, θέρμανση στους 50 °C και εμφάνιση υμενίου PVA που περιείχε το POM άλας (Εποξειδική ρητίνη+ απομάκρυνση PVA POM άλας) και σε δείγματα εποξειδικής ρητίνης που είχαν εμβολιστεί αλυσίδες PVA (Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 1000 s, Εποξειδική ρητίνη+ PVA POM άλας έκθεση 2000 s). Η ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός έγινε μέσω φθορισμού μετά από αντίδραση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με Alexa Fluor 546.

### 3. ΚΑΘΟΔΗΓΟΥΜΕΝΗ ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΩΤΟΠΟΛΥΜΕΡΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

#### 3.1. Επιλογή συστήματος

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η πιο κατάλληλη διεργασία για τη σχηματοποίηση κυττάρων είναι η φωτολιθογραφική διεργασία που βασίζεται στη διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) καθώς εικάζεται ότι μία επιφάνεια που ανθίσταται στην προσρόφηση πρωτεϊνών ανθίσταται και στην προσκόλληση κυττάρων [235]. Συνήθως στη σχηματοποίηση κυττάρων οι δομές που απαιτούνται είναι της τάξης των 10  $\mu\text{m}$ , λόγω του μεγέθους των κυττάρων [104]. Επομένως, η διεργασία που βασίζεται στη διασταύρωση της πολυ(βινυλικής αλκοόλης) είναι κατάλληλη γιατί μπορούν να σχηματιστούν δομές μέχρι 2.5  $\mu\text{m}$  που είναι πολύ μικρότερες από το μέγεθος των κυττάρων (Σχήμα 185).



Σχήμα 185. Σύγκριση του μεγέθους εντόμων, βακτηρίων, κυττάρων, ιών, αντισωμάτων, πρωτεϊνών, ατόμων και μορίων [104].

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διεργασίες τροποποίησης επιφανειών, οι οποίες αποτρέπουν την προσρόφηση πρωτεϊνών, αλλά δεν είναι αποτελεσματικές ως προς την αποτροπή της προσκόλλησης κυττάρων [236, 237]. Γι' αυτό κρίθηκε απαραίτητο να εξεταστεί πειραματικά αν η διασταυρωμένη πολυ(βινυλική αλκοόλη) αποτρέπει την προσκόλληση κυττάρων και αν μπορεί η λιθογραφική διεργασία να συνδυαστεί με μία επιφάνεια που ευνοεί την προσκόλληση των κυττάρων με αποτέλεσμα τελικά να επιτευχθεί η επιλεκτική και κατευθυνόμενη προσκόλληση των κυττάρων πάνω σε μία στερεή επιφάνεια. Η καλλιέργεια των κυττάρων, τα πειράματα ανοσοκυτταρολογίας και η μέτρηση της πιστότητας καθώς και η χημική τροποποίηση της επιφάνειας του Si με κολλαγόνο πραγματοποιήθηκαν από την Δρ. Α. Μπούρκουλα, η οποία εργάζεται στο Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”.

Αρχικά, επιλέχθηκε να σχηματοποιηθούν κύτταρα που ανήκουν στο νευρικό σύστημα. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε θεραπείες νευρολογικών συνδρόμων [238]. Η σχηματοποίηση αυτών των κυττάρων απασχολεί την επιστημονική κοινότητα γιατί είναι σημαντικό να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των κυττάρων με διάφορα υλικά και με διάφορες τοπογραφίες, έτσι ώστε να σχεδιαστούν βιοσυμβατά υλικά τα οποία στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως εμφυτεύματα. Η χημεία και η τοπογραφία των υλικών μπορούν να επηρεάσουν την προσκόλληση των κυττάρων, την ανάπτυξη, τη μετανάστευση, τον προσανατολισμό, την απόπτωση και τη διαφοροποίησή τους [239]. Το κεντρικό νευρικό σύστημα αντιδρά σε εμφυτεύματα κυρίως μέσω της γλοιώσης [240]. Η

γλοίωση είναι η διεργασία κατά την οποία τα αστροκύτταρα πολλαπλασιάζονται και αυξάνονται σε μέγεθος δημιουργώντας ουλή. Επίσης γλοίωση λαμβάνει χώρα σε περιοχές καταστροφής νευρώνων.

Τα κύτταρα που επιλέχθηκαν να σχηματοποιηθούν ήταν τα κύτταρα της σειράς U-87MG που προέρχονται από ανθρώπινο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα και τα κύτταρα της σειράς PC-12 που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου.

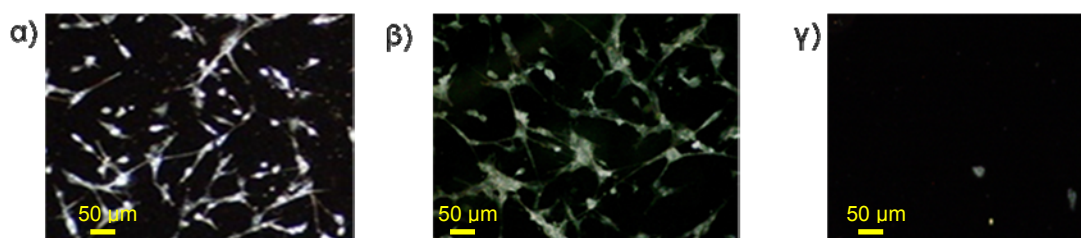
Τα κύτταρα της σειράς U-87MG έχουν αστεροειδές σχήμα και ιδιότητες αστροκυττάρων. Η μελέτη των αστροκυττάρων είναι ενδιαφέρουσα καθώς αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρωνική αναγέννηση και στην υποστήριξη νευρικών κυττάρων. Επίσης τα αστροκύτταρα εκκρίνουν συγκεκριμένες χημειοτακτικές ουσίες και επικοινωνούν με τα νευρικά κύτταρα.

Τα κύτταρα της σειράς PC-12 αποτελούν κλασσικό κυτταρικό μοντέλο για μελέτες στον τομέα των νευροεπιστημών καθώς έχουν πολλές από τις ιδιότητες των φυσιολογικών νευρικών κυττάρων. Έχουν την ιδιότητα να διαφοροποιούνται παρουσία του νευρικού αυξητικού παράγοντα (Nerve Growth Factor, NGF) δηλαδή να σταματάει ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός τους, να εκτείνουν νευρίτες και να γίνονται ηλεκτρικά διεγέρσιμα.

Τέλος, επιλέχθηκε να σχηματοποιηθούν φυσιολογικοί ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες. Η μελέτη των συγκεκριμένων σχηματοποιημένων επιφανειών ως προς την επιλεκτική προσκόλληση φυσιολογικών ινοβλαστών είναι σημαντική για τη θεραπεία εγκαυμάτων, την επούλωση πληγών και την μελέτη ασθενειών του δέρματος.

### 3.2. Επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα με ιδιότητες αστροκυττάρων

Αρχικά, εξετάστηκαν δείγματα πυριτίου και δείγματα διασταυρωμένης PVA που παρασκευάστηκαν πάνω σε δισκία πυριτίου. Σε όλες τις επιφάνειες, διαστάσεων  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ , έγινε σπορά και καλλιέργεια του ίδιου αριθμού κυττάρων ( $4 \times 10^4$  κύτταρα/mL). Συμπεριελήφθησαν δείγματα αναφοράς (κύτταρα καλλιεργημένα σε τρυβλία Petri). Όλα τα δείγματα καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  παρουσία  $5\% \text{ CO}_2$  και κορεσμένη με υγρασία ατμόσφαιρα. Οι συνθήκες και ο τρόπος καλλιέργειας περιγράφεται στο Παράρτημα E.4.1. Η μορφολογία και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων πάνω στις υπό εξέταση επιφάνειες συγκρίθηκαν με τα δείγματα αναφοράς. Η εξέταση των δειγμάτων έγινε με οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου (Σχήμα 186).

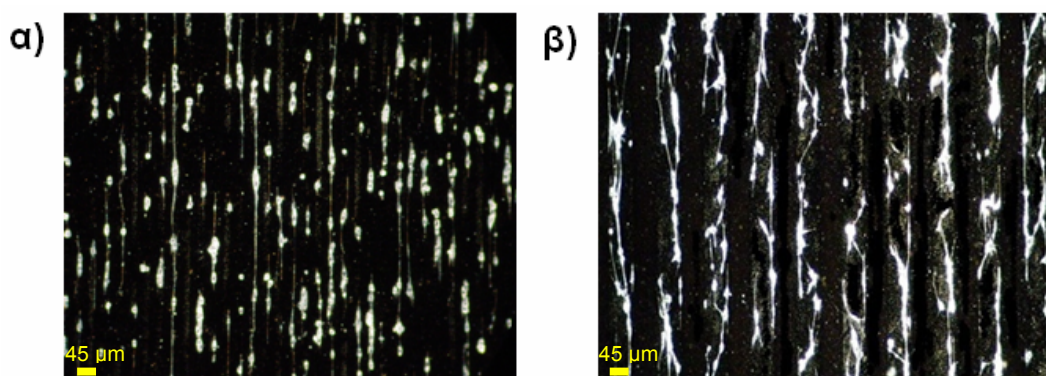


**Σχήμα 186.** α) Κύτταρα U-87MG προσκολλημένα α) πάνω στις επιφάνειες πυριτίου β) σε τρυβλία Petri (δείγμα αναφοράς) γ) σε διασταυρωμένο υμένιο PVA, το οποίο παρασκευάστηκε πάνω σε δισκίο πυριτίου. Και στις τρεις επιφάνειες τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 96 ώρες. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 186, συγκρίνοντας τις εικόνες α) των κυττάρων πάνω σε επιφάνεια πυριτίου και β) των κυττάρων πάνω σε καλλιεργητικό τρυβλίο Petri (δείγμα αναφοράς) που είναι τα ιδανικά υποστρώματα καλλιέργειας κυττάρων συμπεραίνεται ότι τα κύτταρα προσκολλώνται εξίσου καλά πάνω στις επιφάνειες πυριτίου διατηρώντας τη φυσιολογική τους μορφολογία καθόλη τη διάρκεια ελέγχου που ήταν 6-96 ώρες, δηλαδή έχουν αστεροειδές σχήμα. Επίσης φαίνεται ότι τα κύτταρα U-87MG στις επιφάνειες Si πολλαπλασιάζονται με φυσιολογικό ρυθμό. Από την εικόνα γ) του Σχήματος 186 φαίνεται ότι στις επιφάνειες της διασταυρωμένης PVA δεν προσκολλώνται καθόλου τα κύτταρα U-87MG αλλά παρατηρούνται μόνο μερικά θραύσματα αυτών. Επομένως η διασταυρωμένη PVA μπορεί να αξιοποιηθεί για τη δημιουργία δομών που θα αποτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων U-87MG.

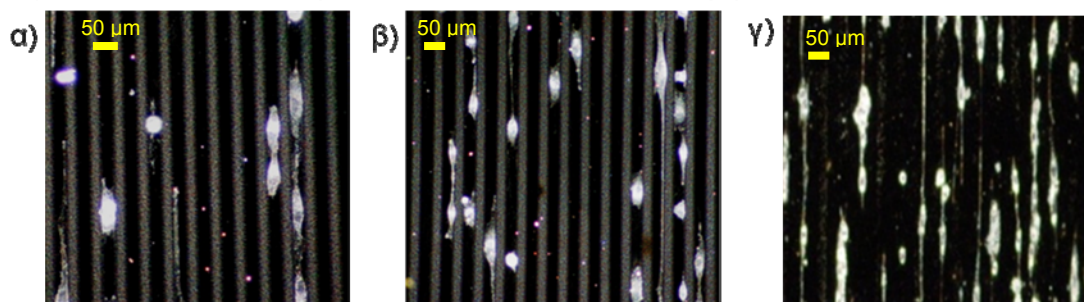
Προκειμένου να γίνει επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων στις επιθυμητές μικροδομές πραγματοποιήθηκε η λιθογραφία του φωτοευαίσθητου διαλύματος της PVA (4.3% PVA, 14.4% 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) πάνω σε δίσκο πυριτίου με αποτέλεσμα τα δείγματα να αποτελούνται από γραμμές διασταυρωμένης PVA και γραμμές πυριτίου με εύρος 10-50  $\mu\text{m}$ .

Κύτταρα U-87MG καλλιεργήθηκαν πάνω στις σχηματοποιημένες επιφάνειες για 48 ώρες. Οι σχηματοποιημένες επιφάνειες είχαν γραμμές διαφορετικού πλάτους. Ενδεικτικά φαίνεται στο Σχήμα 187 η προσκόλληση των κυττάρων στις γραμμές πυριτίου εύρους 25 και 45  $\mu\text{m}$ .



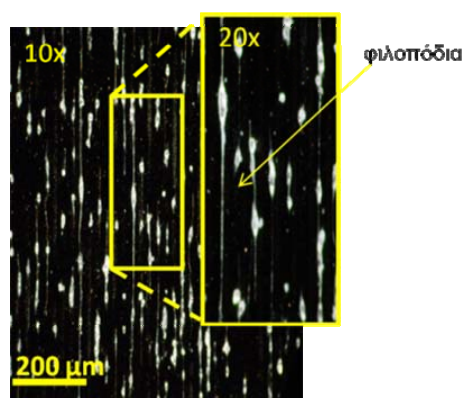
**Σχήμα 187.** Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου στις σχηματοποιημένες επιφάνειες (δομές PVA πάνω σε Si) 48 h μετά την επίστροφή των κυττάρων U-87MG σε δομές Si με πλάτος γραμμών: α) 25 $\mu\text{m}$  και β) 45 $\mu\text{m}$ .

Στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν κύτταρα U-87MG πάνω στις σχηματοποιημένες επιφάνειες PVA για 6-96 ώρες. Ακολούθησε παρατήρηση των σχηματοποιημένων επιφανειών σε οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου (Σχήμα 188).



**Σχήμα 188.** Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου κυττάρων U-87MG καλλιεργημένων πάνω στις σχηματοποιημένες επιφάνειες (δομές 25  $\mu\text{m}$  διασταυρωμένης PVA πάνω σε Si): α) 6h , β) 24 h και γ) 96 h μετά την επίστροφή των κυττάρων U-87MG.

Οι σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου-PVA με τα προσκολλημένα κύτταρα U-87MG για διαφορετικούς χρόνους επώασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 188. Από την παρατήρηση των επιφανειών είναι ευδιάκριτη η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων στις περιοχές του πυριτίου ακόμα και με την πάροδο του χρόνου, ενώ δεν υπάρχουν προσκολλημένα κύτταρα στις περιοχές της διασταυρωμένης PVA. Επίσης από τη σύγκριση των διαφορετικών χρόνων επώασης των κυττάρων U-87MG (Σχήμα 188 α, β και γ) παρατηρείται ότι όσο ο χρόνος επώασης αυξάνεται τόσο περισσότερα κύτταρα προσκολλώνται στις περιοχές Si που σημαίνει ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων δεν παρεμποδίζεται από την τοπογραφία της επιφάνειας και από την παρουσία της διασταυρωμένης PVA. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι όταν το εύρος των γραμμών πυριτίου είναι 22.5 ή 25  $\mu\text{m}$  τα κύτταρα στις περιοχές πυριτίου προσκολλώνται μεμονωμένα, χωρίς να σχηματίζουν συσσωματώματα και συνδέονται εκτείνοντας φιλοπόδια (Σχήμα 189) κατά μήκος των γραμμών πυριτίου πλάτους 25  $\mu\text{m}$  με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διατάξεις μεμονωμένων κυττάρων U-87MG σε γραμμικές συστοιχίες.



**Σχήμα 189.** Μορφολογία κυττάρων U-87MG προσκολλημένα σε σχηματοποιημένη επιφάνεια PVA:Si πάχους γραμμών 25  $\mu\text{m}$  1:1.

Αυτό, όπως θα επιβεβαιωθεί και από άλλα πειράματα, οφείλεται στο πλάτος των γραμμών Si που έχουν σχηματιστεί με τη λιθογραφία της PVA, το οποίο στην προκειμένη περίπτωση είναι 25  $\mu\text{m}$  και είναι περίπου ίδιο με το μέγεθος ενός κυττάρου U-87MG.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας που προσκολλώνται στις σχηματοποιημένες επιφάνειες με διαφορετικό πλάτος γραμμών πυριτίου-PVA καθώς και ο αριθμός των κυττάρων που προσκολλώνται σε δείγμα πυριτίου και σε δείγμα διασταυρωμένης PVA μετά από 24 h επώασης των κυττάρων U-87MG σε όλα τα δείγματα. Ο αριθμός των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στο δείγμα πυριτίου ήταν  $4827 \pm 964$  κύτταρα/ $\text{cm}^2$ . Ο αριθμός των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στο δείγμα διασταυρωμένης PVA ήταν  $56 \pm 12$  κύτταρα/ $\text{cm}^2$ . Ο αριθμός των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στις σχηματοποιημένες επιφάνειες παρουσιάζεται στον Πίνακα 21.

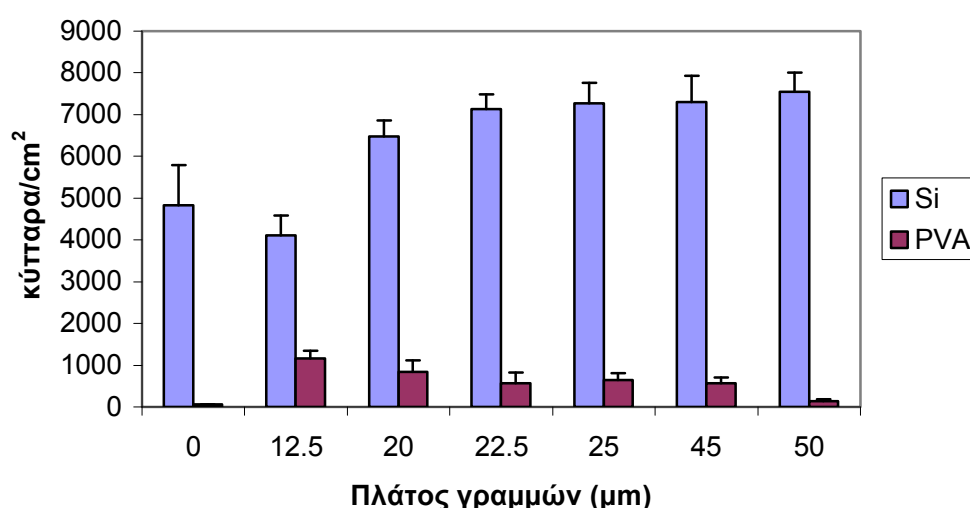
Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας στις περιοχές Si των σχηματοποιημένων επιφανειών ήταν σχεδόν ίσος (για το δείγμα 1, το οποίο είχε πλάτος γραμμών 12.5  $\mu\text{m}$ ) ή μεγαλύτερος (δείγματα 2-6) σε σχέση με το δείγμα πυριτίου. Από αυτήν την παρατήρηση συμπεραίνεται ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε επιφάνειες πυριτίου είναι ίδιος με το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες. Επομένως,



επιβεβαιώνεται και σε αυτό το πείραμα ότι τα κύτταρα δεν επηρεάζονται από τη διασταυρωμένη PVA που περιβάλλει τις περιοχές Si στις σχηματοποιημένες επιφάνειες. Επιπρόσθετα από τις μετρήσεις που αφορούσαν τον αριθμό των κυττάρων στις γραμμές της διασταυρωμένης PVA συμπεραίνεται ότι οι γραμμές της διασταυρωμένης PVA στις σχηματοποιημένες επιφάνειες αποτρέπουν την προσκόλληση κυττάρων U-87MG ικανοποιητικά ειδικά όταν το πλάτος τους είναι ίσο ή μεγαλύτερο από το μέγεθος των κυττάρων, δηλαδή όταν το πλάτος των γραμμών της PVA είναι ίσο ή μεγαλύτερο από 20  $\mu\text{m}$ . Τέλος, παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται το πλάτος των γραμμών Si τόσο περισσότερα κύτταρα προσκολλώνται σε αυτές, αποδεικνύοντας την προτίμηση των κυττάρων U-87MG να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν στο Si και όχι στην PVA. Συνολικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 190.

**Πίνακας 21.** Αριθμός προσκολλημένων κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες. Οι σχηματοποιημένες επιφάνειες αποτελούνται από γραμμές Si και από γραμμές PVA ίδιου πλάτους για κάθε δείγμα. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκαν ξεχωριστά τα κύτταρα που προσκολλήθηκαν στις γραμμές Si και στις γραμμές PVA.

Δείγμα	Πλάτος γραμμών ( $\mu\text{m}$ )	Κύτταρα/ $\text{cm}^2$ στο Si	Κύτταρα/ $\text{cm}^2$ στην PVA
1	12.5	4107 $\pm$ 482	1161 $\pm$ 187
2	20	6473 $\pm$ 390	837 $\pm$ 281
3	22.5	7131 $\pm$ 361	570 $\pm$ 256
4	25	7277 $\pm$ 489	643 $\pm$ 169
5	45	7305 $\pm$ 633	570 $\pm$ 134
6	50	7545 $\pm$ 462	134 $\pm$ 55



**Σχήμα 190.** Αριθμός κυττάρων/ $\text{cm}^2$  στις περιοχές Si και στις περιοχές PVA για διαφορετικό πλάτος γραμμών.

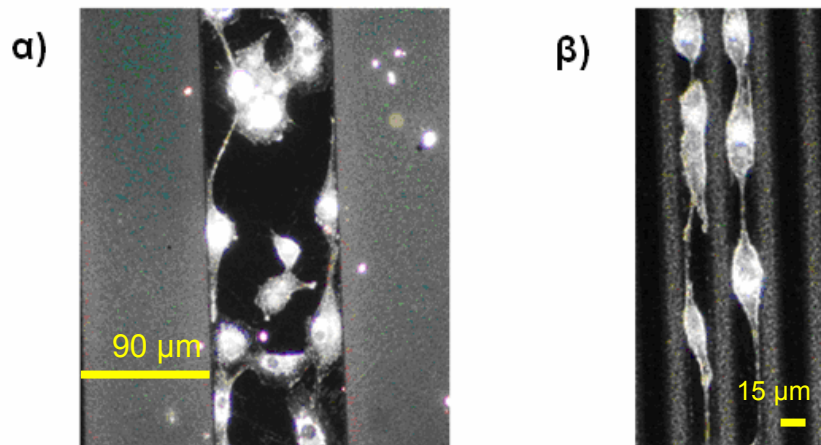
Από το Σχήμα 190 φαίνεται ότι τα κύτταρα της σειράς U-87MG εμφανίζουν πολύ καλή επιλεκτικότητα όταν οι γραμμές πυριτίου/PVA κυμαίνονται από 22.5-50

μm με την καλύτερη όταν το εύρος γραμμών πυριτίου είναι 50 μm. Συνολικά, μέσω αυτού του πειράματος αποδεικνύεται ότι το τελικό υμένιο διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης) αποτρέπει ικανοποιητικά την προσκόλληση κυττάρων U-87MG και δεν επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξή τους.

Η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων στις περιοχές πυριτίου αξιολογήθηκε σε σύγκριση με τον ίδιο αριθμό κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri (δείγμα ελέγχου) και παρατηρήθηκε η μορφολογία τους και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους. Βρέθηκε ότι τα κύτταρα U-87MG προσκολλώνται στις σχηματοποιημένες επιφάνειες διατηρώντας τη φυσιολογική τους μορφολογία και πολλαπλασιάζονται με φυσιολογικό ρυθμό.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν πολλές σχηματοποιημένες επιφάνειες με διαφορετικό πλάτος γραμμών με σκοπό την επίτευξη της καλύτερης γραμμικής διάταξης των κυττάρων U-87MG. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν γραμμές πυριτίου διαφορετικού πλάτους, από 2.5-150 μm.

Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα προσκολλώνται και αναπτύσσονται σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με πλάτος γραμμών ίσο ή μεγαλύτερο από 10 μm. Σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με πλάτος γραμμών μικρότερο από 10 μm τα κύτταρα U-87MG δεν εμφανίζουν τόσο μεγάλη επιλεκτικότητα ως προς τις γραμμές πυριτίου επειδή το πλάτος των γραμμών Si δεν είναι επαρκές για την προσκόλληση κυττάρων U-87MG καθώς το μέγεθος ενός κυττάρου U-87MG είναι περίπου 20 μm. Σε δομές πυριτίου μεγαλύτερες από 45 μm τα κύτταρα εμφανίζουν πολύ μεγάλη επιλεκτικότητα αλλά δεν σχηματίζουν γραμμικές συστοιχίες με την συνένωση των απολήξεων τους. Ενδεικτικά φαίνεται στο Σχήμα 191 η προσκόλληση των κυττάρων και ο τρόπος σύνδεσής τους όταν το εύρος γραμμών πυριτίου είναι 90 μm (Σχήμα 191 α) και 15 μm (Σχήμα 191 β).



**Σχήμα 191.** Μορφολογία κυττάρων U-87MG προσκολλημένων σε εύρος γραμμών Si: α) 90 μm και β) 15μm. Φωτογραφίες κυττάρων U-87MG από οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Γραμμικές συστοιχίες μεμονωμένων κυττάρων U-87MG επιτυγχάνονται για σχηματοποιημένες επιφάνειες με πλάτος γραμμών Si 20 μm και 22.5 μm.

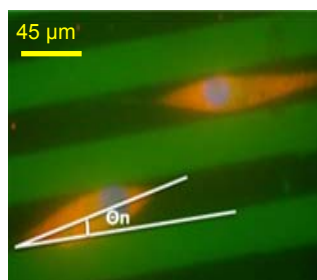
Ακολουθώς, έγιναν πειράματα προσδιορισμού της πιστότητας των κυττάρων σε σχέση με τις γραμμές πυριτίου. Για το σκοπό αυτό ήταν απαραίτητη η χρώση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των κυττάρων. Η χρώση του κυτταροπλάσματος έγινε με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της όξινης ινδιακής πρωτεΐνης των γλοιοκυττάρων (anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, anti-GFAP) επισημασμένο με κυανίνη 3 (Cyanine 3, Cy3) και του πυρήνα έγινε με 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI). Η διεργασία της χρώσης των κυττάρων U-

87MG παρουσιάζεται στο Παράρτημα Ε.4.2. Η πιστότητα των κυττάρων υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Πιστότητα} = 1 - \frac{\theta_n}{90^\circ} \quad (10)$$

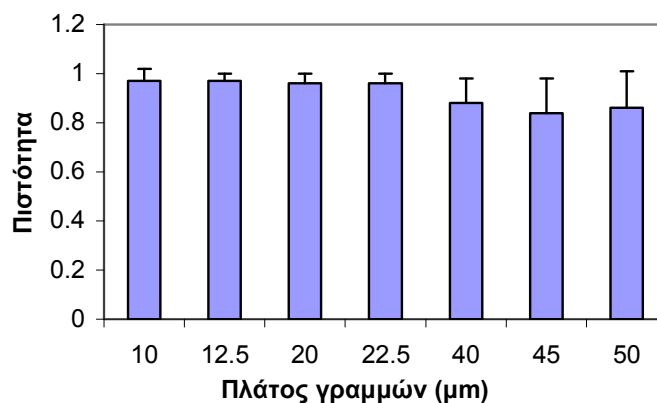
Όπου  $\theta_n$ , όπως φαίνεται στο Σχήμα 192, ορίζεται ως η γωνία που σχηματίζει ο μεγάλος άξονας του κυττάρου με την γραμμή της PVA. Τα κύτταρα θεωρούνται ευθυγραμμισμένα όταν:

$$0.89 \leq \text{πιστότητα} \leq 1 \quad (11)$$



**Σχήμα 192.** Φωτογραφίες από μικροσκοπίου φθορισμού κυττάρου της σειράς U-87MG μετά από χρώση του κυτταροπλάσματος με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της όξινης ινδιακής πρωτεΐνης των γλοιοκυττάρων (anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, anti-GFAP) επισημασμένο με κυανίνη 3 (Cyanine 3, Cy3) και του πυρήνα με 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI).

Κατόπιν, έγινε στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με εύρος γραμμών από 10-50  $\mu\text{m}$  (Σχήμα 193).



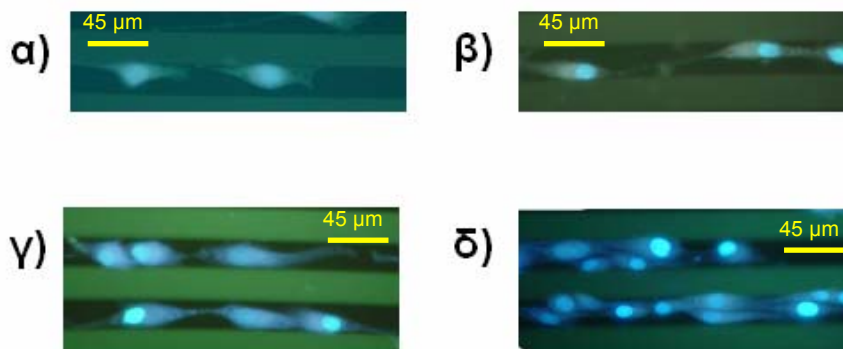
**Σχήμα 193.** Ραβδόγραμμα πιστότητας των κυττάρων U-87MG συναρτήσει του εύρους γραμμών πυριτίου για δομές από 10  $\mu\text{m}$  έως 50  $\mu\text{m}$ .

Όπως αποδεικνύεται από το ραβδόγραμμα του Σχήματος 193, η πιστότητα των προσκολλημένων κυττάρων είναι μεγαλύτερη από 0.96 για δομές πυριτίου από 10-22.5  $\mu\text{m}$ , ενώ μειώνεται κάτω από 0.88 όταν το εύρος των γραμμών πυριτίου κυμαίνεται από 40-50  $\mu\text{m}$ . Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στις μεγαλύτερες δομές επιτρέπεται στα κύτταρα, λόγω του μεγέθους τους, να σχηματίσουν μεγαλύτερη γωνία και κατά συνέπεια έχουν μικρότερη πιστότητα.

Με βάση το πείραμα προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας που προσκολλώνται στις δομές πυριτίου και PVA (Σχήμα 190) και το πείραμα προσδιορισμού της πιστότητας (Σχήμα 193) συμπεραίνεται ότι η καλύτερη

επιλεκτικότητα σε συνδυασμό με την καλύτερα οργανωμένη γραμμική διάταξη των κυττάρων U-87MG επιτεύχθηκε στις γραμμές Si πλάτους 22.5  $\mu\text{m}$ .

Επίσης, μελετήθηκε η διατήρηση της πιστότητας των κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο καλλιέργειας τους. Τα κύτταρα της σειράς U-87MG καλλιεργήθηκαν πάνω σε σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου με εύρος γραμμών 22.5  $\mu\text{m}$  και αξιολογήθηκε η πιστότητα τους για χρόνο καλλιέργειας από 1 έως 5 ημέρες (Σχήμα 194).

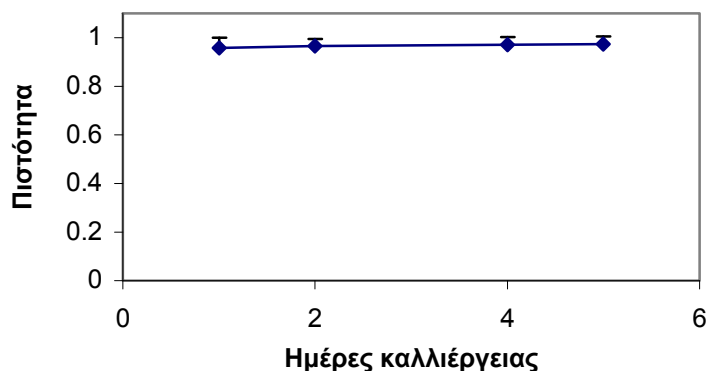


**Σχήμα 194.** Κύτταρα U-87MG πάνω σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με εύρος γραμμών 22.5  $\mu\text{m}$  για χρόνους καλλιέργειας: α) 1 ημέρα, β) 2 ημέρες, γ) 4 ημέρες και δ) 5 ημέρες. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Με βάση τον τύπο της πιστότητας που προαναφέρθηκε υπολογίστηκε η πιστότητα της προσκόλλησης των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας. Στον Πίνακα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα, τα οποία φαίνονται και στη γραφική παράσταση του Σχήματος 195.

**Πίνακας 22.** Πιστότητα σε γραμμές Si πλάτους 22.5  $\mu\text{m}$  για τα κύτταρα U-87MG για καλλιέργεια 1, 2, 4, 5 ημερών.

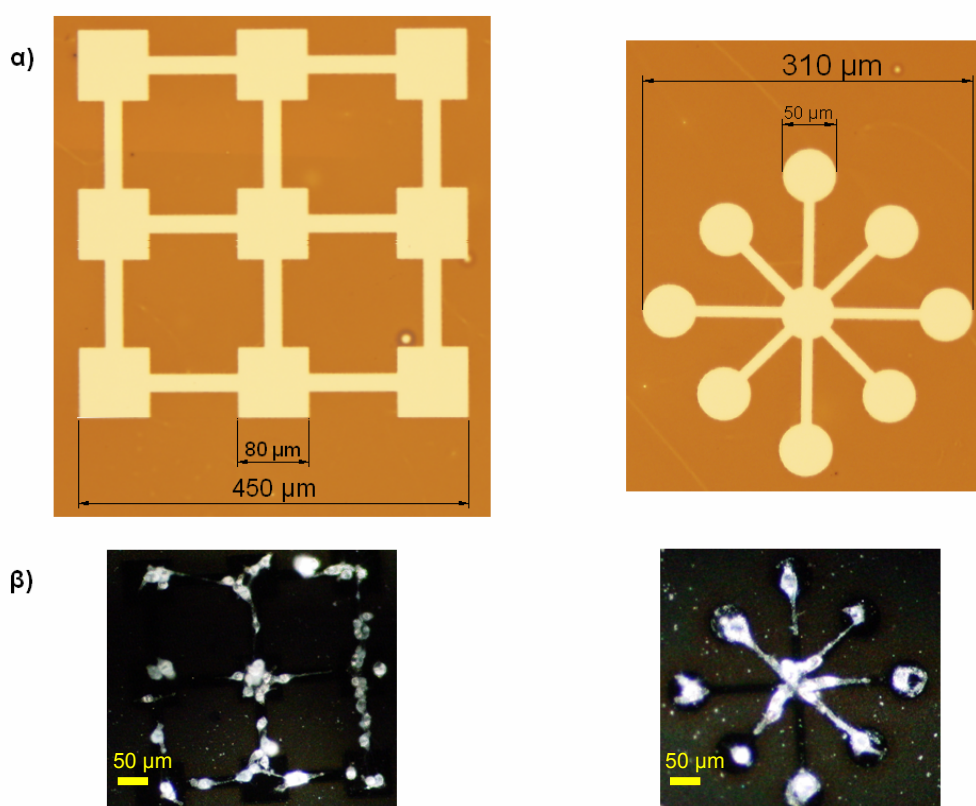
Ημέρες καλλιέργειας	Πιστότητα
1	0.957
2	0.967
4	0.970
5	0.973



**Σχήμα 195.** Γραφική παράσταση της πιστότητας των κυττάρων U-87MG σε γραμμές Si πλάτους 22.5  $\mu\text{m}$  συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας.

Διαπιστώθηκε ότι η πιστότητα των κυττάρων πάνω στις γραμμές πυριτίου αυξάνεται συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας των κυττάρων πάνω στις σχηματοποιημένες επιφάνειες (Πίνακας 22 και Σχήμα 195). Επομένως, τα κύτταρα διατηρούνται ευθυγραμμισμένα στις σχηματοποιημένες επιφάνειες παρόλο που συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται.

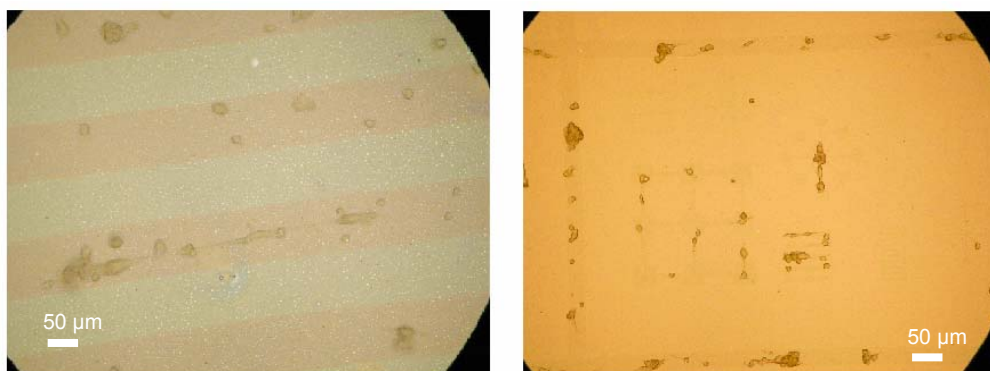
Τα κύτταρα επίσης σχηματοποιήθηκαν σε πιο πολύπλοκες δομές που παρασκευάστηκαν μετά από έκθεση με μάσκα λιθογραφίας αντίστοιχου σχήματος. Η λιθογραφία πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες: Επίστρωση στις 4000 rpm για 30 s. Θέρμανση στους 70 °C για 1 min. Έκθεση μέσω μάσκας σε δόση 48.7 mJ/cm<sup>2</sup>. Θέρμανση στους 88 °C για 3 min. Εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min. Οι δομές που επετεύχθησαν με αυτόν τον τρόπο παρουσιάζονται στο Σχήμα 196. Ακολούθησε καλλιέργεια κυττάρων U-87MG πάνω στις σχηματοποιημένες επιφάνειες.



**Σχήμα 196.** α) Λιθογραφία της PVA σε διάφορα σχήματα πάνω σε δισκίο πυριτίου, τα οποία ελήφθησαν με χρήση κατάλληλης μάσκας λιθογραφίας. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με οπτικό μικροσκόπιο. β) Προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων σε αυτές τις σχηματοποιημένες επιφάνειες (δομές διασταυρωμένης PVA πάνω σε δισκίο Si). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η λιθογραφία της PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου. Η επίστρωση του πολυστυρενίου έγινε πάνω σε δισκίο πυριτίου, το οποίο είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (Hexamethyldisilazane, HMDS). Συγκεκριμένα η εξαμεθυλοδισιλαζάνη επιστρώθηκε μέσω περιστροφής στις 4000 rpm για 1 min. Στη συνέχεια επιστρώθηκε μέσω περιστροφής το πολυστυρένιο από διάλυμα πολυστυρενίου 2% κ.β. διαλυμένο σε MIBK. Η επίστρωση έγινε στις 2000 rpm για 1 min. Ακολούθησε θέρμανση στους 120 °C για 5 min. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η λιθογραφική διεργασία της PVA. (Πειραματικές συνθήκες για

τη λιθογραφία της PVA: Επίστρωση στις 4000 rpm για 30 s διαλύματος που περιείχε 4.3% κ.β. PVA και 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ σε απιονισμένο νερό. Θέρμανση στους 70 °C για 1 min. Έκθεση σε ακτινοβολία UV μέσω μάσκας λιθογραφίας και φίλτρου 254 nm (δόση έκθεσης 78.0 mJ/cm<sup>2</sup>). Θέρμανση στους 88 °C για 3 min. Εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min.). Έπειτα σε σχηματοποιημένες επιφάνειες 1\*1 cm<sup>2</sup> έγινε σπορά και καλλιέργεια κυττάρων U-87MG. Η επώαση έγινε στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub> και κορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα για 48 ώρες (Σχήμα 197).



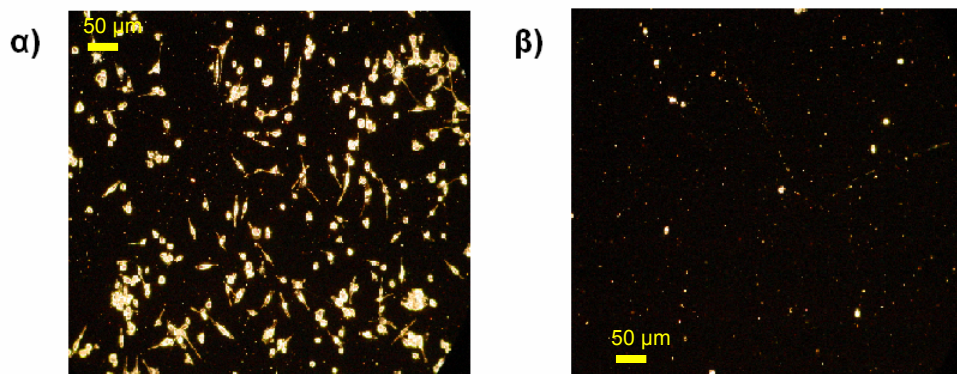
**Σχήμα 197.** Προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων U-87MG σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με δομές διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

Στις σχηματοποιημένες επιφάνειες της PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα προσκολλώνται επιλεκτικά στις περιοχές του πολυστυρενίου αλλά δεν αποκτούν τη φυσιολογική τους μορφολογία και δεν πολλαπλασιάζονται με φυσιολογικό ρυθμό, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται σποραδικά και όχι σε όλες τις περιοχές του αποκεκαλυμμένου πολυστυρενίου (Σχήμα 197). Προκειμένου να προσδιοριστεί η παράμετρος που επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων στις περιοχές του αποκεκαλυμμένου πολυστυρενίου πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων, τα οποία παρατίθενται παρακάτω.

Αρχικά, μελετήθηκε η προσκόλληση των κυττάρων U-87MG σε επιφάνειες πολυστυρενίου χωρίς την πραγματοποίηση της λιθογραφικής διεργασίας της PVA (Σχήμα 198 α) και μετά τη λιθογραφική διεργασία της PVA (Σχήμα 198 β). Για την παρασκευή του δείγματος πολυστυρενίου το δισκίο πυριτίου τροποποιήθηκε με HMDS (επίστρωση 4000 rpm για 1 min) στο οποίο στη συνέχεια επιστρώθηκε, μέσω περιστροφής, το πολυστυρένιο (επίστρωση στις 2000 rpm για 1 min από διάλυμα πολυστυρενίου 2% κ.β. διαλυμένο σε MIBK, θέρμανση στους 120 °C για 5 min). Στη συνέχεια στο δείγμα πολυστυρενίου επιφάνειας 1\*1 cm<sup>2</sup> πραγματοποιήθηκε σπορά και καλλιέργεια 4\*10<sup>4</sup> κυττάρων U-87MG. Η επώαση έγινε στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub> και κορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα για 48 ώρες. Το δείγμα αυτό συγκρίθηκε με δείγμα πολυστυρενίου που είχε παρασκευαστεί με τον ίδιο τρόπο και είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA. (Πειραματικές συνθήκες για τη λιθογραφία της PVA: Επίστρωση στις 4000 rpm για 30 s διαλύματος 4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ σε απιονισμένο νερό. Θέρμανση στους 70 °C για 1 min. Θέρμανση στους 88 °C για 3 min. Εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min.). Στο δείγμα (1\*1 cm<sup>2</sup>) που είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία της PVA πραγματοποιήθηκε σπορά και καλλιέργεια 4\*10<sup>4</sup> κυττάρων U-87MG. Η

επώαση έγινε στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub> και κορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα για 48 ώρες.

Παρατηρείται στο Σχήμα 198 ότι τα κύτταρα προσκολλώνται στην αρχική επίστρωση του πολυστυρενίου, ενώ δεν προσκολλώνται στην επιφάνεια του πολυστυρενίου που είχε υποστεί τη λιθογραφική διεργασία (επίστρωση, θερμάνσεις και εμφάνιση) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που περιείχε το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ). Επομένως από αυτό το πείραμα συμπεραίνεται ότι η λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που περιείχε το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ επηρεάζει το υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου.



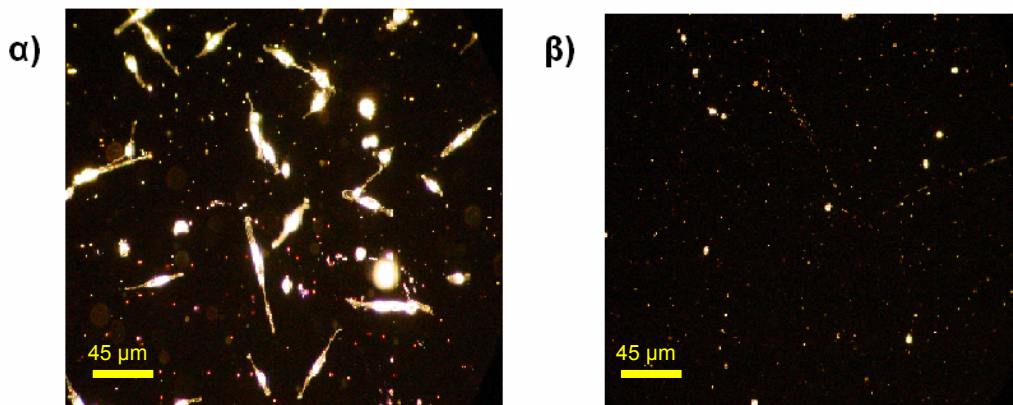
**Σχήμα 198.** Προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων U-87MG: α) σε υμένιο πολυστυρενίου αρχικό και β) σε υμένιο πολυστυρενίου μετά τη λιθογραφική διεργασία (επίστρωση, θερμάνσεις και εμφάνιση) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που περιείχε το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Στη συνέχεια, έγιναν προσπάθειες προκειμένου να προσδιοριστεί το στάδιο κατά το οποίο επηρεάζεται το υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου.

Παρασκευάστηκαν δύο δείγματα πολυστυρενίου, τα οποία είχαν υποστεί τη λιθογραφική διεργασία της PVA αλλά στο πρώτο δείγμα δεν είχαν πραγματοποιηθεί τα στάδια της θέρμανσης. Συγκεκριμένα, η επίστρωση του πολυστυρενίου έγινε πάνω σε δισκίο πυριτίου το οποίο είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε και στα προηγούμενα πειράματα. Στο πρώτο δείγμα πραγματοποιήθηκαν η επίστρωση και η εμφάνιση (πειραματικές συνθήκες: επίστρωση στις 4000 rpm για 30 s, εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min) του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ), ενώ στο δεύτερο δείγμα πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια της λιθογραφικής διεργασίας εκτός από το στάδιο της έκθεσης (πειραματικές συνθήκες: επίστρωση στις 4000 rpm για 30 s διαλύματος 4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ σε απιονισμένο νερό. Θέρμανση στους 70 °C για 1 min. Θέρμανση στους 88 °C για 3 min. Εμφάνιση με διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min.). Στη συνέχεια στα δείγματα (1\*1 cm<sup>2</sup>) πραγματοποιήθηκε σπορά και καλλιέργεια 4\*10<sup>4</sup> κυττάρων U-87MG. Η επώαση έγινε στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub> και κορεσμένη σε υγρασία ατμόσφαιρα για 48 ώρες (Σχήμα 199).

Από το Σχήμα 199 συμπεραίνεται ότι στο υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου δεν προσκολλώνται τα κύτταρα U-87MG όταν αυτό έχει υποστεί όλη τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (Επίστρωση στις 4000 rpm για 30 s διαλύματος 4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ σε απιονισμένο νερό. Θέρμανση στους 70 °C για 1 min. Θέρμανση στους 88 °C για 3 min. Εμφάνιση

με διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min), ενώ στο υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου προσκολλώνται τα κύτταρα U-87MG όταν αυτό έχει υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA χωρίς την πραγματοποίηση των σταδίων της θέρμανσης (PAB στους 70 °C για 1 min και PEB στους 88 °C για 1 min).



**Σχήμα 199.** Προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων U-87MG: α) σε υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση και την εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) χωρίς την πραγματοποίηση των σταδίων της θέρμανσης και β) σε υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση PAB στους 70 °C για 1 min και PEB στους 88 °C για 3 min και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Η επίδραση του σταδίου της θέρμανσης στο υμένιο πολυστυρενίου μελετήθηκε περαιτέρω μέσω Μικροσκοπίου Ατομικών Δυνάμεων (AFM). Η λήψη των εικόνων AFM έγινε από την Δρ. Ε. Μακαρώνα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η τραχύτητα των ακόλουθων υμενίων πολυστυρενίου: α) Υμένιο πολυστυρενίου σκέτο (Σχήμα 200) β) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min της PVA απουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (PVA σκέτη) (Σχήμα 201) γ) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος παραλείποντας τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB) (Σχήμα 202) δ) Υμένιο πολυστυρενίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ) (Σχήμα 203) ε) Υμένιο πολυστυρενίου μετά από κατεργασία με νερό και πραγματοποίηση όλων των σταδίων της λιθογραφικής διεργασίας, δηλαδή PAB στους 70 °C για 1 min, PEB στους 88 °C για 3 min και εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min (Σχήμα 204). Τα υμένια πολυστυρενίου επιστρώθηκαν πάνω σε δισκίο πυριτίου (επίστρωση στις 2000 rpm για 1 min από διάλυμα πολυστυρενίου 2% κ.β. διαλυμένο σε MIBK, θέρμανση στους 120 °C για 5 min), το οποίο είχε αρχικά τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (επίστρωση 4000 rpm για 1 min). Οι διαστάσεις των σαρώσεων είναι 1μm x 1μm και 2μm x 2μm.

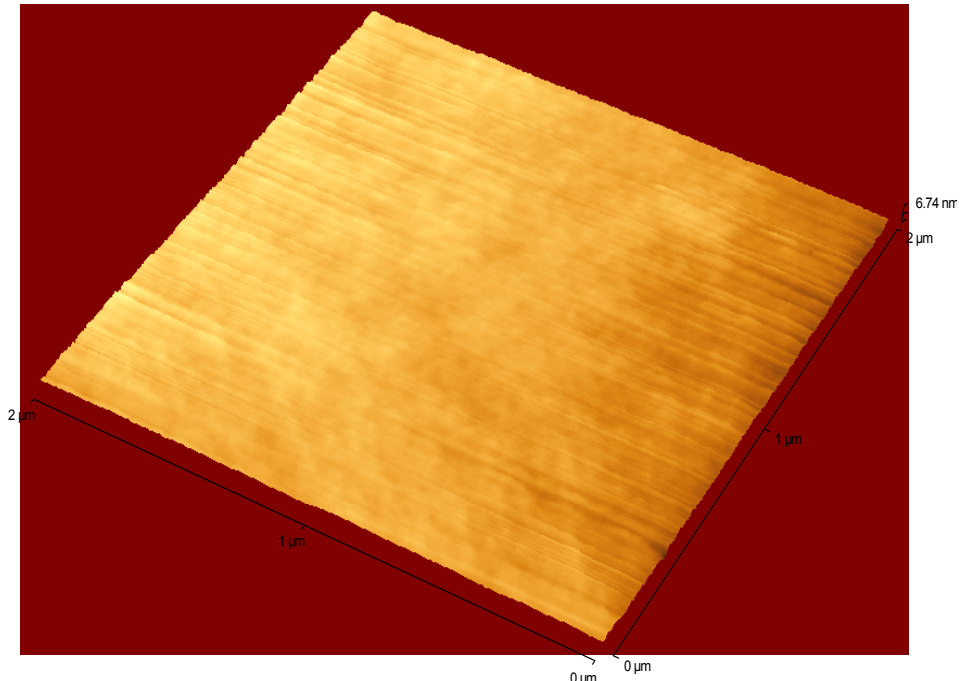
Στον Πίνακα 23 δίνονται τα χαρακτηριστικά μεγέθη τα οποία αφορούν την τραχύτητα αυτών των επιφανειών πολυστυρενίου όπως προσδιορίστηκαν από την



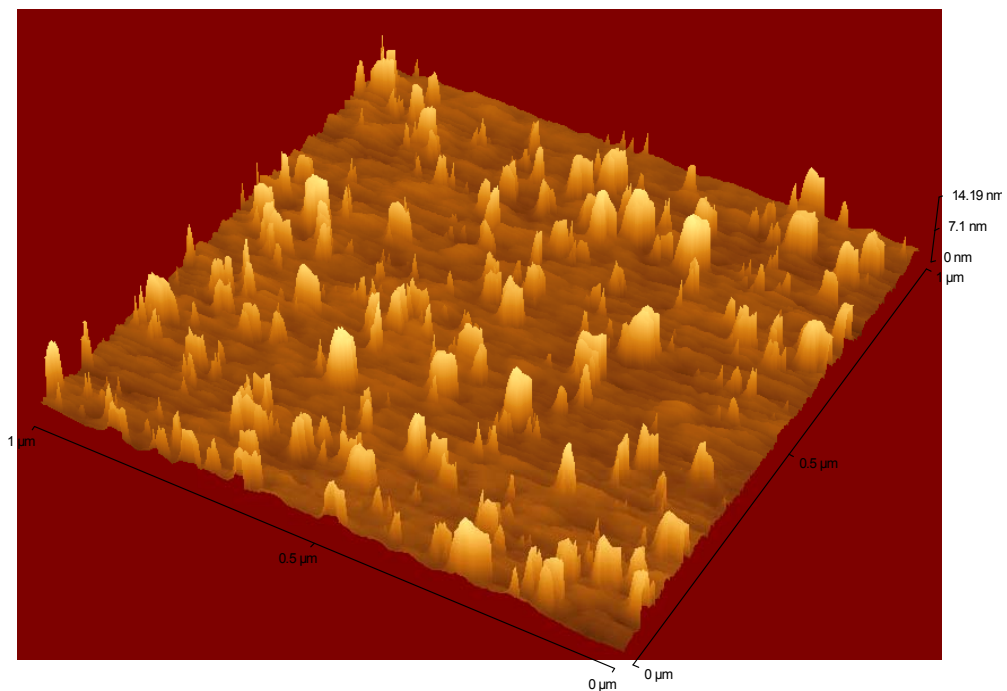
επεξεργασία των εικόνων που ελήφθησαν από το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (AFM) (Σχήματα 200-204).

**Πίνακας 23.** Χαρακτηριστικά μεγέθη για την τραχύτητα των επιφανειών πολυστυρενίου όπως προσδιορίστηκαν από την επεξεργασία των εικόνων που ελήφθησαν από το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (AFM) (Σχήματα 200-204). Τα υμένια πολυστυρενίου επιστρώθηκαν πάνω σε δισκίο πυριτίου, το οποίο είχε τροποποιηθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνη (HMDS).

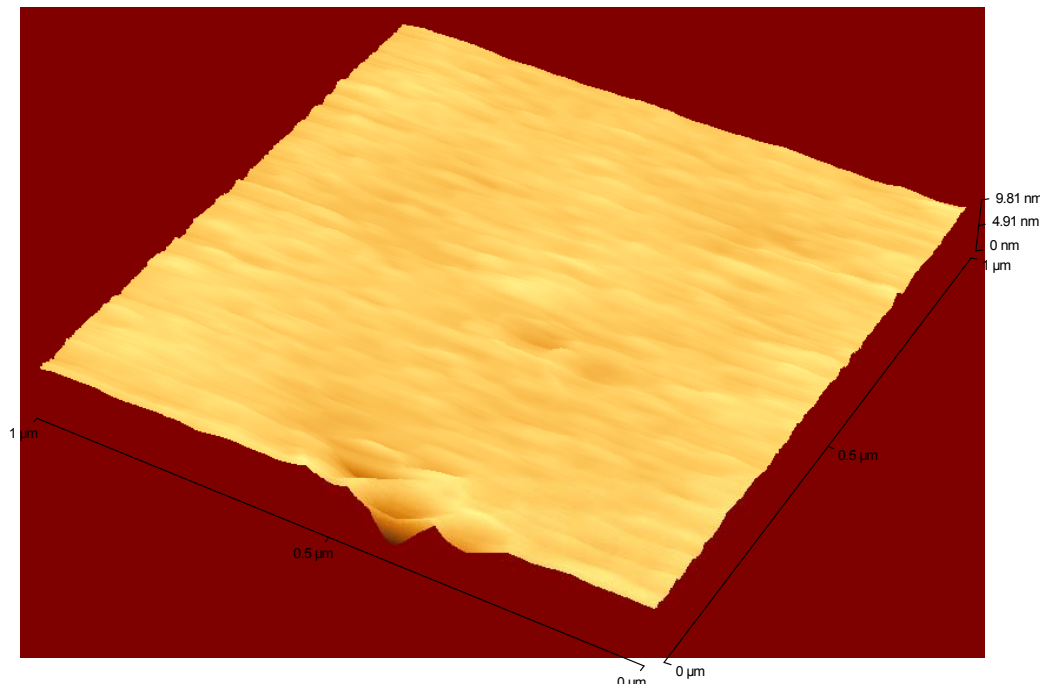
Υμένιο	τραχύτητα rms (nm)	Μέσο ύψος δομών (nm)	Μέσο πλάτος δομών (nm)
1. Υμένιο PS σκέτο	0.33	5.36	1.9
2. Υμένιο PS μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min της PVA απουσία POM (PVA σκέτη)	1.63	3.25	14.19
3. Υμένιο PS μετά την επίστρωση και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) παραλείποντας τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB)	0.46	7.97	9.82
4. Υμένιο PS μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία της POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM)	5.53	18.25	28
5. Υμένιο PS μετά από κατεργασία με νερό και τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB), στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού (1:1 v/v) για 2 min.	0.29	5.57	2.72



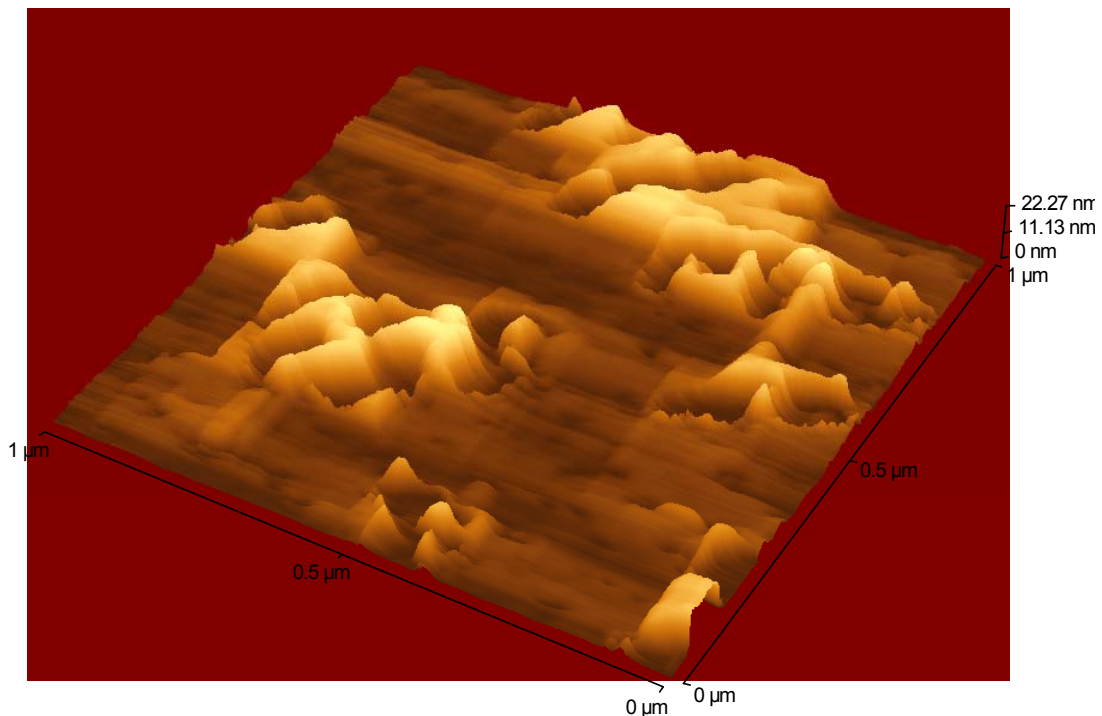
**Σχήμα 200.** Τρισδιάστατη απεικόνιση από εικόνα AFM για το αρχικό υμένιο πολυουρετανίου σκέτο. Διάσταση σάρωσης 2 x 2 μm.



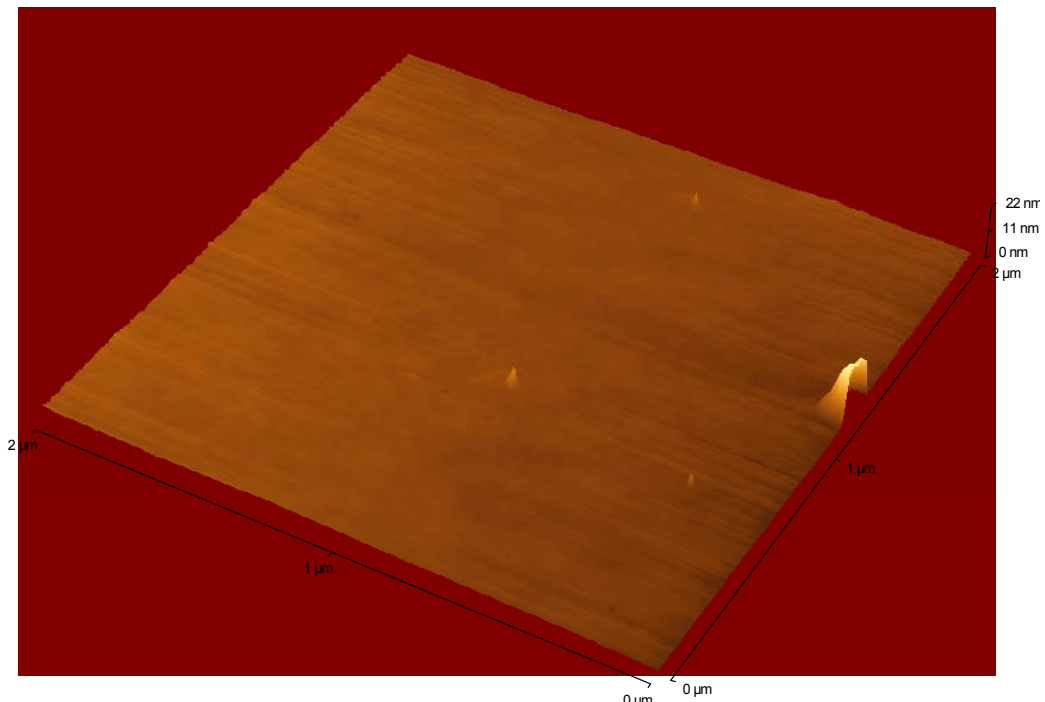
**Σχήμα 201.** Τρισδιάστατη απεικόνιση από εικόνα AFM για το υμένιο πολυουρετανίου μετά την επίστρωση της PVA, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min της PVA απουσία ΠΟΜ (PVA σκέτη). Διάσταση σάρωσης 1 x 1 μm.



**Σχήμα 202.** Τρισδιάστατη απεικόνιση από εικόνα AFM για το υμένιο πολυουρετανίου μετά την επίστρωση και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου PVA και POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM) χωρίς την πραγματοποίηση των σταδίων της θέρμανσης (PAB και PEB). Διάσταση σάρωσης 1 x 1 μm.



**Σχήμα 203.** Τρισδιάστατη απεικόνιση από εικόνα AFM για το υμένιο πολυουρετανίου μετά την επίστρωση, τη θέρμανση στους 70 °C για 1 min (PAB) και στους 88 °C για 3 min (PEB) και την εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία POM (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM). Διάσταση σάρωσης 1 x 1 μm.



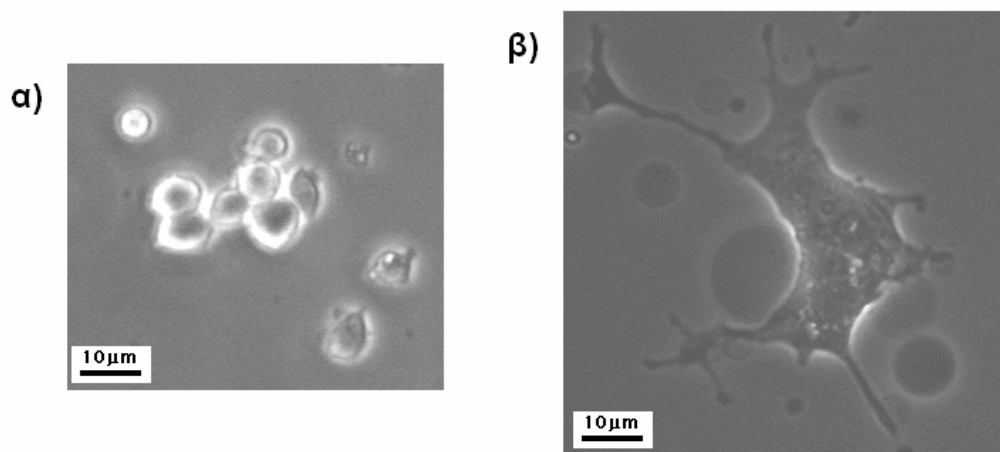
**Σχήμα 204.** Τρισδιάστατη απεικόνιση από εικόνα AFM για το υμένιο πολυστουρενίου μετά από κατεργασία με νερό και πραγματοποιώντας όλα τα στάδια της λιθογραφικής διεργασίας (PAB στους 70 °C για 1 min, PEB στους 88 °C για 3 min και εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min).

Από τον Πίνακα 23 και τα Σχήματα 200-204 παρατηρείται ότι το υμένιο σκέτου πολυστουρενίου έχει πολύ μικρή τραχύτητα. Επίσης, φαίνεται ότι το υμένιο πολυστουρενίου δεν επηρεάζεται από το νερό και τα στάδια της θέρμανσης και της εμφάνισης. Επηρεάζεται λίγο από την εναπόθεση της PVA που δεν περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (PVA σκέτη) ακολουθώντας όλα τα στάδια της λιθογραφίας, ενώ επηρεάζεται πάρα πολύ όταν ακολουθείται όλη η λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος (4.3% κ.β. PVA, 14.4% κ.β. POM), δηλαδή όταν πραγματοποιείται η επίστρωση, το PAB στους 70 °C για 1 min, το PEB στους 88 °C για 3 min και η εμφάνιση σε διάλυμα μεθανόλης νερού για 2 min. Παρατηρείται επίσης ότι αν η λιθογραφική διεργασία δεν περιελάμβανε τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB) θα είχε μικρότερη επίδραση στην επιφάνεια του πολυστουρενίου. Όμως, αυτό δεν είναι εφικτό καθώς τότε δεν θα ελάμβανε χώρα η διασταύρωση της PVA στις εκτεθειμένες περιοχές. Η μεταβολή αυτή στο υμένιο του πολυστουρενίου αποδίδεται στη φυσική προσρόφηση αλυσίδων PVA, το οποίο έχει αναφερθεί και στο Κεφάλαιο Γ.2.2.3.3.1. Από τις παρατηρήσεις αυτές καθώς και από τις παρατηρήσεις από τα πειράματα που αφορούν την προσρόφηση πρωτεϊνών (Γ.2.2.3.3.2) και την προσκόλληση κυττάρων συμπεραίνεται ότι τα υπολείμματα της PVA επηρεάζουν την προσκόλληση των κυττάρων, ενώ δεν επηρέαζαν την προσρόφηση των πρωτεϊνών. Αυτό αποδίδεται σε ενδεχόμενη εκρόφιση των προσροφημένων αλυσίδων PVA με παράλληλη προσρόφηση της πρωτεΐνης στο υμένιο πολυστουρενίου στην περίπτωση επώασης σε διάλυμα πρωτεϊνών, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία [61]. Η εκρόφιση των προσροφημένων αλυσίδων PVA από το υμένιο του πολυστουρενίου είναι αδύνατη όταν η επιφάνεια εμβαπτίζεται στο θρεπτικό υλικό που περιέχει τα κύτταρα, με αποτέλεσμα αυτά να μην προσκολλώνται στο πολυστουρένιο που έχει υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ως φωτο-ευαίσθητοποιητή.

Επειδή όμως, η λιθογραφία της PVA είναι αδύνατο να επιτευχθεί χωρίς την πραγματοποίηση των σταδίων της θέρμανσης, ειδικά του PEB, γιατί σε υψηλές θερμοκρασίες λαμβάνει χώρα η διασταύρωση της PVA, το υμένιο πολυστυρενίου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσκόλληση των κυττάρων της καρκινικής σειράς U-87MG, όταν πάνω σε αυτό έχει λιθογραφηθεί το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA παρουσία του φωτοευαίσθητοποιητή 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος.

### 3.3. Επιλεκτική προσκόλληση κυττάρων που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί και να αξιολογηθεί περαιτέρω η αποτροπή της προσκόλλησης των κυττάρων στα σχηματοποιημένα υμένια πολυ(βινυλικής αλκοόλης) πραγματοποιήθηκαν πειράματα με κύτταρα που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12 (Σχήμα 205). Τα κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12 όταν επωαστούν με νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) διαφοροποιούνται, εκτείνουν νευρίτες και προσομοιάζουν σε νευρικά κύτταρα (Σχήμα 205 β).

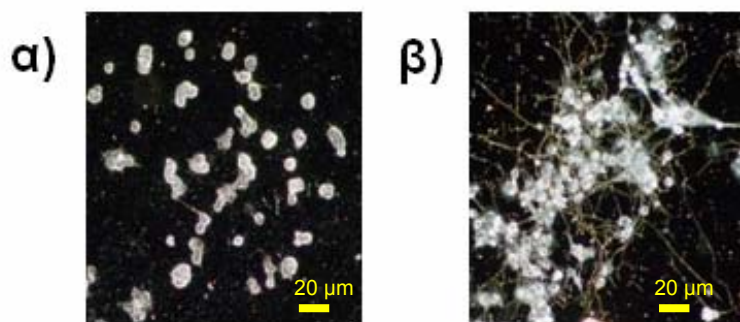


**Σχήμα 205.** α) Αδιαφοροποίητα κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12. β) Διαφοροποιημένο κύτταρο της καρκινικής σειράς PC-12 μετά την επώαση του για πέντε ημέρες με τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) [241].

Τα κύτταρα της σειράς PC-12 έχουν την ιδιότητα να αναπτύσσονται στο εναιώρημα. Προκειμένου να επιτευχθεί η σχηματοποίηση των κυττάρων PC-12 ήταν απαραίτητη, αρχικά, η εύρεση κατάλληλου υποστρώματος στο οποίο θα προσκολληθούν τα κύτταρα PC-12. Αρχικά, μελετήθηκε η προσκόλληση των κυττάρων PC-12 πάνω σε επιφάνειες Si. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σπορά και καλλιέργεια των κυττάρων πάνω σε δισκία πυριτίου. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με την παρουσία νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF) αλλά και χωρίς αυτόν για 5 ημέρες σε επωαστικό κλίβανο και διαπιστώθηκε ότι τόσο τα διαφοροποιημένα όσο και τα αδιαφοροποίητα κύτταρα δεν προσκολλώνται στις επιφάνειες Si.

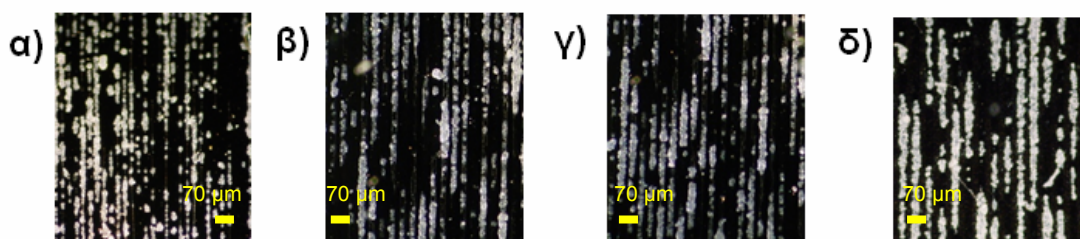
Προκειμένου να επιτευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων PC-12 μελετήθηκε η τροποποίηση της επιφάνειας Si με κολλαγόνο (βλέπε Παράρτημα Ε.4.3). Αρχικά, το δισκίο Si τροποποιήθηκε με 3-αμινοπροπυλο-τριαθοξυσιλάνιο (APTES). Στη συνέχεια, το κολλαγόνο προσροφήθηκε στην επιφάνεια Si, που είχε τροποποιηθεί με το αμινοσιλάνιο, μέσω επώασης για 12 h σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub> και κορεσμένη με υγρασία ατμόσφαιρα) με διάλυμα κολλαγόνου συγκέντρωσης 100 μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 50mM pH 7.0. Τα κύτταρα της σειράς PC-12 καλλιεργήθηκαν πάνω στις τροποποιημένες με κολλαγόνο επιφάνειες

με και χωρίς νευρικό αυξητικό παράγοντα για 5 ημέρες (βλέπε Παράρτημα Ε.4.4). Στο πείραμα συμπεριλαμβάνονταν και δείγματα αναφοράς (κύτταρα καλλιεργημένα μέσα σε τρυβλία Petri). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 206 β τα κύτταρα διατηρούν την ιδιότητα τους να διαφοροποιούνται και να εκτείνουν νευρίτες. Επίσης, τόσο τα αδιαφοροποίητα (Σχήμα 206 α) όσο και τα διαφοροποιημένα κύτταρα (Σχήμα 206 β) προσκολλώνται στις τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου με αποτέλεσμα να μας δίνεται η δυνατότητα σχηματοποίησής τους.



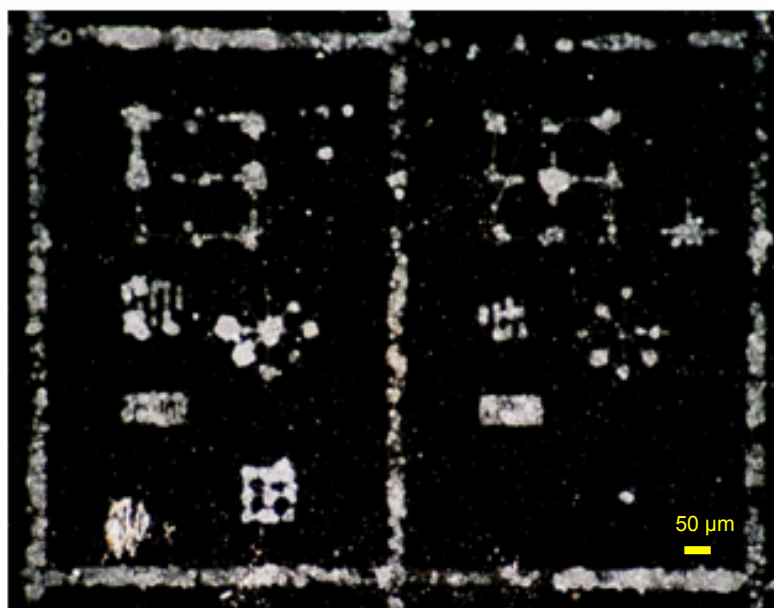
**Σχήμα 206.** Κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12 προσκολλημένα στις επιφάνειες Si που έχουν τροποποιηθεί με κολλαγόνο: α) Αδιαφοροποίητα κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12. β) Διαφοροποιημένα κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12 με την προσθήκη νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF) για πέντε ημέρες. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η λιθογραφία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA πάνω στις επιφάνειες Si, οι οποίες είχαν τροποποιηθεί με κολλαγόνο. Σε δείγματα  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  έγινε σπορά  $3 \times 10^4$  κυττάρων PC-12 και αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο. Την επόμενη ημέρα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με νέο το οποίο περιείχε  $100 \text{ ng/mL}$  νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF) και ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων σε επωαστικό κλίβανο για 6 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 2 ημέρες με καινούριο το οποίο περιείχε τον παράγοντα διαφοροποίησης ( $100 \text{ ng/mL}$  νευρικού αυξητικού παράγοντα). Τέλος, οι επιφάνειες στις οποίες είχαν προσκολληθεί τα κύτταρα εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH 7.0 τελικής συγκέντρωσης  $50 \text{ mM}$  για να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα και οι επιφάνειες παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο (Σχήμα 207).



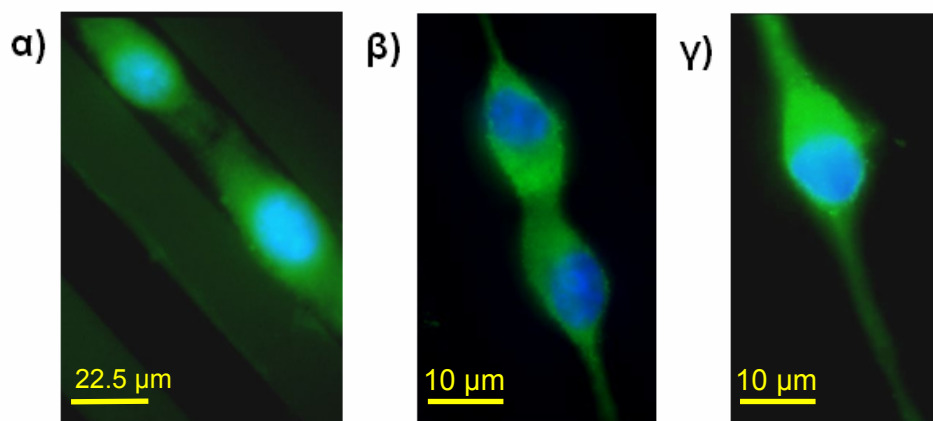
**Σχήμα 207.** Διαφοροποιημένα κύτταρα της σειράς PC-12 προσκολλημένα στις περιοχές Si που έχουν τροποποιηθεί με κολλαγόνο με πλάτος δομών: α)  $12.5 \mu\text{m}$ , β)  $20 \mu\text{m}$ , γ)  $22.5 \mu\text{m}$  και δ)  $35 \mu\text{m}$ . Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 207 τα κύτταρα PC-12 εμφανίζουν πολύ μεγάλη επιλεκτικότητα στις γραμμές πυριτίου σχηματίζοντας γραμμικές διατάξεις. Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε με πιο πολύπλοκες δομές πυριτίου που κατασκευάστηκαν με μάσκα λιθογραφίας ανάλογου σχήματος (Σχήμα 208).



**Σχήμα 208.** Διαφοροποιημένα κύτταρα της κυτταρικής σειράς PC-12 προσκολλώνται στις περιοχές Si που έχουν τροποποιηθεί με κολλαγόνο σε πολύπλοκες δομές πυριτίου που έχουν κατασκευαστεί με μάσκα λιθογραφίας αντίστοιχου σχήματος. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Κατόπιν αξιολογήθηκε η ευθυγράμμιση των κυττάρων PC-12 στις σχηματοποιημένες επιφάνειες πυριτίου (Σχήμα 209). Για την καλύτερη αξιολόγηση της προσκόλλησης των κυττάρων PC-12 έγινε χρώση του κυτταροπλάσματος με μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της συσχετιζόμενης με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης 2 (Microtubule-associated protein 2, MAP-2) επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία Alexa fluor 488 και του πυρήνα των κυττάρων με 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI) (βλέπε Παράρτημα Ε.4.5).

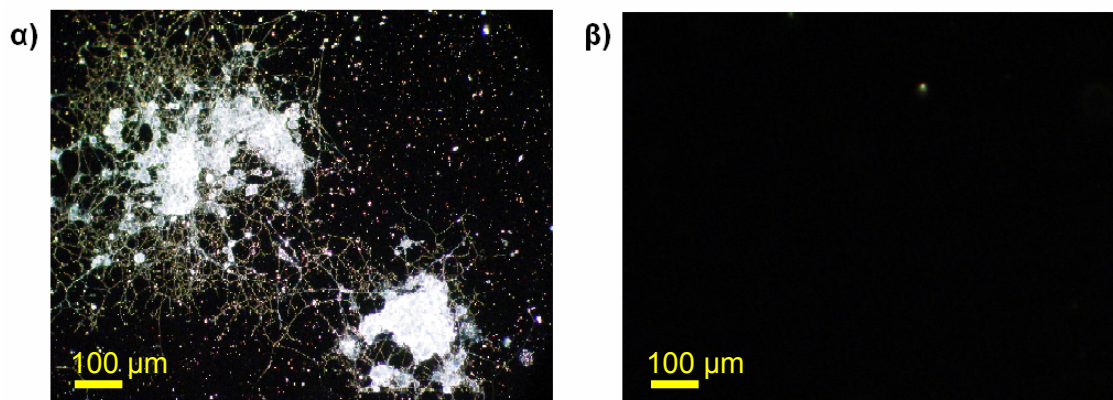


**Σχήμα 209.** Σχηματική απεικόνιση διαφοροποιημένων κυττάρων της σειράς PC-12 προσκολλημένων πάνω σε σχηματοποιημένες περιοχές πυριτίου με πλάτος: α) 22.5 μm, β) 12.5 μm και γ) 10 μm. Η χρώση του κυτταροπλάσματος έγινε με μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της πρωτεΐνης MAP-2 επισημασμένο με Alexa Fluor 488 και η χρώση του πυρήνα με DAPI. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Όπως φαίνεται και από τις εικόνες του Σχήματος 209 τα διαφοροποιημένα κύτταρα PC-12 προσκολλώνται με μεγάλη επιλεκτικότητα στις γραμμές πυριτίου που έχουν τροποποιηθεί με κολλαγόνο και εκτείνουν νευρίτες ακριβώς πάνω σε αυτές.

Επίσης, παρατηρείται πολύ καλή γραμμική διάταξη των κυττάρων ακόμα και σε γραμμές με πλάτος 10  $\mu\text{m}$ . Η διάταξη των κυττάρων PC-12 σε γραμμές μικρότερου εύρους από ότι τα κύτταρα U-87MG οφείλεται στο μικρότερο μέγεθός τους.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν δείγματα πολυστυρενίου τροποποιημένα με κολλαγόνο και διασταυρωμένη PVA (Σχήμα 210). Τα δείγματα πολυστυρενίου τροποποιήθηκαν με κολλαγόνο μετά από εμβάπτιση των επιφανειών πολυστυρενίου για 12 h σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub>) σε διάλυμα κολλαγόνου συγκέντρωσης 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , το οποίο ήταν διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 50mM pH 7.0.



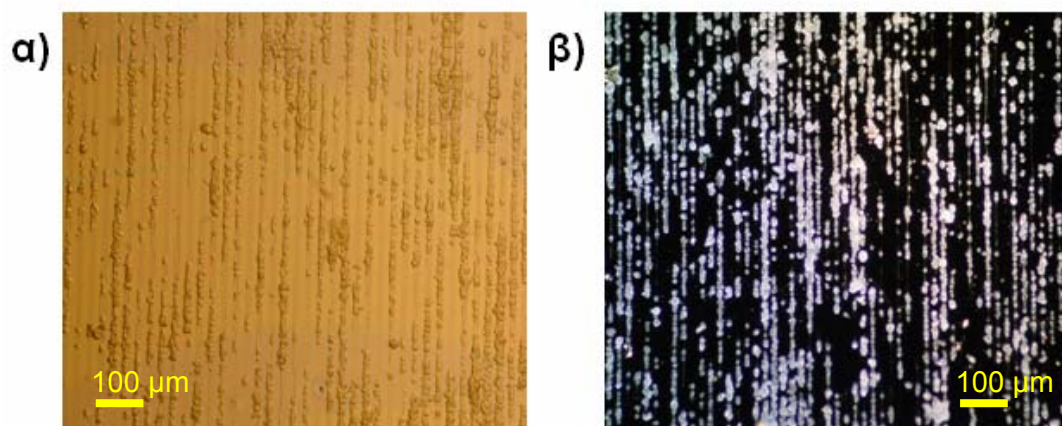
**Σχήμα 210.** α) Τα κύτταρα PC-12 προσκολλώνται στις επιφάνειες πολυστυρενίου που έχουν τροποποιηθεί με κολλαγόνο και διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησής τους μετά από επώαση σε θρεπτικό υλικό που περιείχε το νευρικό αυξητικό παράγοντα, ενώ β) τα κύτταρα PC-12 δεν προσκολλώνται στις επιφάνειες της διασταυρωμένης PVA. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε οπτικό μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

Παρατηρείται ότι τα κύτταρα προσκολλώνται στις επιφάνειες πολυστυρενίου που τροποποιήθηκαν με κολλαγόνο (Σχήμα 210 α), ενώ δεν προσκολλώνται στις επιφάνειες της διασταυρωμένης PVA (Σχήμα 210 β). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε λιθογραφία της PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου, το οποίο είχε τροποποιηθεί με κολλαγόνο. Σε δείγματα  $1*1 \text{ cm}^2$  έγινε σπορά  $3*10^4$  κυττάρων της καρκινικής σειράς PC-12 και ακολούθησε καλλιέργεια σε επωαστικό κλίβανο για 5 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 5% κ.ό. εμβρυϊκό ορό βοός, 10% κ.ό. ορό αλόγου, 1% κ.ό. γλουταμίνη και 1% κ.ό. πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη, ανανεωνόταν κάθε 2 ημέρες, ενώ στις 5 ημέρες αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 5% κ.ό. εμβρυϊκό ορό βοός, 10% κ.ό. ορό αλόγου, 1% κ.ό. γλουταμίνη και 1% κ.ό. πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη, το οποίο περιείχε επιπλέον το νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) σε τελική συγκέντρωση 100  $\text{ng}/\text{mL}$ . Στη συνέχεια, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 50mM pH 7.0 για να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα. Τέλος, τα δείγματα παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο για να αξιολογηθεί η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων στις αποκεκαλυμμένες περιοχές πολυστυρενίου-κολλαγόνου, η μορφολογία τους και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους (Σχήμα 211).

Οι συγκεκριμένες επιφάνειες δεν επηρεάστηκαν από τη λιθογραφική διεργασία γιατί υπήρχε ένα υμένιο κολλαγόνου ανάμεσα στα δύο στρώματα, το οποίο δεν επηρεάζεται τόσο πολύ από τη λιθογραφική διεργασία της PVA όσο επηρεάζεται το πολυστυρένιο όταν έρχεται σε άμεση επαφή με το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ. Όπως φαίνεται στις εικόνες του



Σχήματος 211 τα διαφοροποιημένα κύτταρα PC-12 προσκολλώνται με μεγάλη επιλεκτικότητα στις γραμμές πολυστερενίου που έχουν τροποποιηθεί με κολλαγόνο και εκτείνουν νευρίτες ακριβώς πάνω σε αυτές και εδώ παρατηρείται πολύ καλή γραμμική διάταξη των κυττάρων σε γραμμές με πλάτος 10 μm.



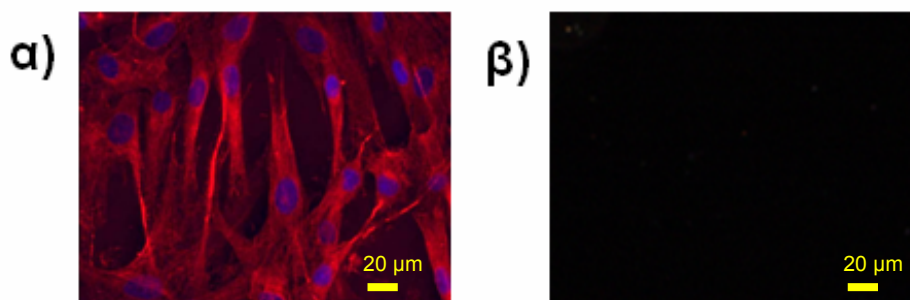
**Σχήμα 211.** Διαφοροποιημένα κύτταρα της σειράς PC-12 προσκολλημένα στις περιοχές πολυστερενίου που έχουν τροποποιηθεί με κολλαγόνο με πλάτος δομών 10 μm. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί σε οπτικό μικροσκόπιο: α) φωτεινού πεδίου και β) σκοτεινού πεδίου.

Συνολικά στις σχηματοποιημένες επιφάνειες βρέθηκε ότι τα κύτταρα PC-12 προσκολλώνται επιλεκτικά στις αποκεκαλυμμένες περιοχές του πυριτίου-κολλαγόνου (Σχήμα 207 και 208) και του πολυστερενίου-κολλαγόνου (Σχήμα 211) έναντι των περιοχών της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης). Επίσης, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και η βιωσιμότητα των κυττάρων PC-12 που είχαν προσκολληθεί στις σχηματοποιημένες επιφάνειες ήταν συγκρίσιμος με αυτόν που παρατηρείται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία Petri (δείγμα ελέγχου).

### 3.4. Επιλεκτική προσκόλληση ινοβλαστών από φυσιολογικό ανθρώπινο ιστό δέρματος

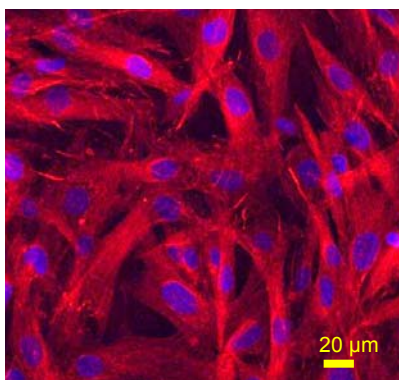
Σε βιολογικές μελέτες που αφορούν τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση χρησιμοποιούνται φυσιολογικά κύτταρα και όχι καρκινικές σειρές, γιατί τα καρκινικά κύτταρα φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με αυτές τις διαδικασίες. Επομένως, ήταν σημαντική η αξιολόγηση των σχηματοποιημένων επιφανειών ως προς την επιλεκτική προσκόλληση φυσιολογικών κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο μελετήθηκε η επιλεκτική προσκόλληση ινοβλαστών, οι οποίοι είχαν απομονωθεί από ανθρώπινο ιστό δέρματος. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και ελήφθησαν από το Ινστιτούτο Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “Δημόκριτος” από τον Ερευνητή Α' Βαθμίδας Δρ. Δ. Κλέτσα. Οι ινοβλάστες έχουν απομονωθεί μετά από έγκριση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “Δημόκριτος”.

Αρχικά εξετάστηκαν επιφάνειες Si και επιφάνειες διασταυρωμένης PVA για να διαπιστωθεί αν οι ινοβλάστες προσκολλώνται στα δισκία Si αποκτώντας τη φυσιολογική τους μορφολογία και αν η διασταυρωμένη PVA αποτρέπει την προσκόλλησή τους (βλέπε Παράρτημα Ε.4.6). Για να είναι δυνατή η παρατήρηση της μορφολογίας των ινοβλαστών ήταν απαραίτητη η χρώση των ινοβλαστών γι' αυτό οι εικόνες που παρουσιάζονται είναι εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού (Σχήμα 212). Η διεργασία της χρώσης των ινοβλαστών παρουσιάζεται στο Παράρτημα Ε.4.7.



**Σχήμα 212.** α) Οι ινοβλάστες προσκολλώνται στις επιφάνειες Si αποκτώντας τη φυσιολογική τους μορφολογία. Η χρώση του κυτταροπλάσματος έγινε με αντίσωμα ποντικού κατά της τουμπουλίνης, στο οποίο προσδέθηκε το αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού επισημασμένο με Alexa Fluor 546 nm. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DAPI. β) Οι ινοβλάστες δεν προσκολλώνται στις επιφάνειες της διασταυρωμένης PVA. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

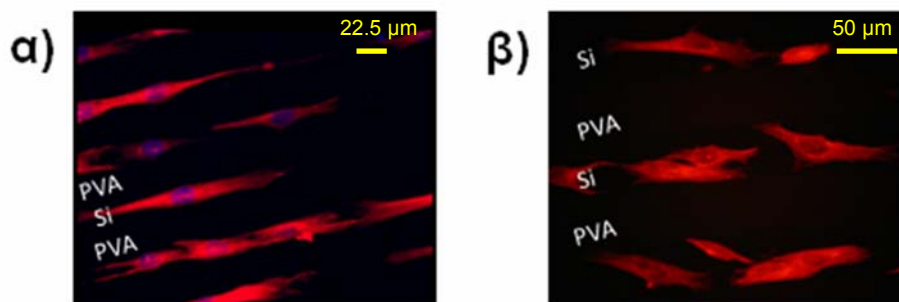
Από το Σχήμα 212 παρατηρείται ότι οι ινοβλάστες προσκολλώνται σε επιφάνειες Si αποκτώντας τη φυσιολογική τους μορφολογία (Σχήμα 212 α), ενώ δεν προσκολλώνται στις επιφάνειες της διασταυρωμένης PVA (Σχήμα 212 β). Επίσης μελετήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών στις επιφάνειες Si και συγκρίθηκε με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους σε τρυβλία Petri (Σχήμα 213).



**Σχήμα 213.** Μορφολογία φυσιολογικών ινοβλαστών καλλιεργημένων σε τρυβλία Petri για πέντε ημέρες. Η χρώση του κυτταροπλάσματος έγινε με αντίσωμα ποντικού κατά της τουμπουλίνης, στο οποίο προσδέθηκε το αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού επισημασμένο με Alexa Fluor 546 nm. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DAPI. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί από μικροσκόπιο φθορισμού.

Από τα πειράματα βρέθηκε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών που είχαν προσκολληθεί στα δισκία Si είναι συγκρίσιμος με αυτόν που παρατηρείται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία Petri (δείγμα ελέγχου) για χρονικό διάστημα καλλιέργειας έως 9 ημέρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λιθογραφία της PVA πάνω σε δισκίο Si και σε δείγματα  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  έγινε σπορά του ίδιου αριθμού ινοβλαστών και ακολούθησε καλλιέργεια σε επωαστικό κλίβανο για 5 ημέρες. Ακολούθως, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 50mM pH 7.0 για να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η διεργασία της χρώσης των ινοβλαστών προκειμένου να αξιολογηθεί η επιλεκτική προσκόλληση των ινοβλαστών στις αποκεκαλυμμένες περιοχές Si έναντι των γειτονικών περιοχών της διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης), η μορφολογία τους, η ευθυγράμμιση και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού

τους. Οι σχηματοποιημένες επιφάνειες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 5 ημέρες καλλιέργειας των ινοβλαστών (Σχήμα 214).



**Σχήμα 214.** Οι ινοβλάστες δεν προσκολλώνται στις περιοχές της διασταυρωμένης PVA ενώ προσκολλώνται στις περιοχές Si με πλάτος δομών: α) 22.5 μm, β) 50 μm. Οι ινοβλάστες επωάστηκαν στις σχηματοποιημένες επιφάνειες για 5 ημέρες. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Από το Σχήμα 214 παρατηρείται ότι οι ινοβλάστες δεν προσκολλώνται στις περιοχές της διασταυρωμένης PVA, ενώ προσκολλώνται στις περιοχές Si. Οι ινοβλάστες στις σχηματοποιημένες επιφάνειες με εύρος γραμμών 22.5 μm παρουσιάζονται κατευθυνόμενοι σε μια γραμμική διάταξη (Σχήμα 214 α), ενώ σε μεγαλύτερο πλάτος γραμμών πυριτίου εμφανίζουν και πάλι μεγάλη επιλεκτικότητα ως προς το πυρίτιο, αλλά δεν είναι τόσο κατευθυνόμενοι γιατί σχηματίζουν γωνίες με τις γραμμές PVA (Σχήμα 214 β). Από τα πειράματα βρέθηκε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, καθώς, και η βιωσιμότητα των ινοβλαστών, που είχαν προσκολληθεί στις σχηματοποιημένες επιφάνειες, είναι συγκρίσιμος με αυτόν που παρατηρείται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία Petri (δείγμα ελέγχου) για χρονικό διάστημα καλλιέργειας έως 9 ημέρες. Επομένως οι σχηματοποιημένες επιφάνειες μπορούν να αξιοποιηθούν για την επιλεκτική προσκόλληση φυσιολογικών κυττάρων, στα οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν βιολογικές μελέτες που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο, τη γήρανση καθώς και άλλες διαδικασίες. Επίσης τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα καθοδηγούμενης προσκόλλησης κυττάρων πάνω στις σχηματοποιημένες επιφάνειες *in vitro* ανοίγουν το δρόμο για περαιτέρω αξιολόγηση των υμενίων διασταυρωμένης πολυ(βινυλικής αλκοόλης) σε *in vivo* πειράματα για την πιθανή χρησιμοποίησή τους σε εμφυτεύματα.



## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της Διδακτορικής Διατριβής η οποία αφορούσε τη **φωτοχημική τροποποίηση λεπτών πολυμερικών υμενίων για εφαρμογές στη Νανοβιοτεχνολογία** εκπληρώθηκαν οι εξής στόχοι:

1. **Διερευνήθηκαν πιθανοί τρόποι σχηματοποίησης βιολογικών μορίων σε στερεές επιφάνειες μέσω χημικής πρόσδεσης** και αναπτύχθηκε διεργασία σχηματοποίησης της βιοτίνης σε σχηματοποιημένη εποξειδική ρητίνη.
2. **Αναπτύχθηκε φωτοευαίσθητο πολυμερικό υλικό με βάση την πολυ(βινυλική αλκοόλη), το οποίο μπορεί να σχηματοποιηθεί με φωτολιθογραφία και αποτρέπει την προσρόφηση πρωτεϊνών και την προσκόλληση κυττάρων.**

Ο λόγος που επιλέχθηκε η διερεύνηση της ακινητοποίησης της βιοτίνης είναι η δυνατότητα της στρεπταβιδίνης να προσδένεται στην ακινητοποιημένη βιοτίνη με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ακινητοποίηση οποιασδήποτε βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης πάνω στη στρεπταβιδίνη. Για τη σχηματοποίηση της βιοτίνης διερευνήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι: η μέθοδος της αποκόλλησης (lift-off) και η μέθοδος της ακινητοποίησης πάνω σε φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο.

Στη μέθοδο της αποκόλλησης (lift-off) το υπόστρωμα πυριτίου είχε τροποποιηθεί με Αυτοοργανωμένο Μονομοριακό Στρώμα (ΑΜΣ) αμινοσιλανίου και η καθοδήγηση της πρόσδεσης της βιοτίνης και των παραγώγων της πραγματοποιήθηκε με τη λιθογραφία ενός φωτοευαίσθητου υλικού θετικού τόνου, το οποίο περιείχε ακρυλικό τετραπολυμερές και φωτοπαραγωγό οξέος, το οποίο έχει προταθεί για την ακινητοποίηση πολλών πρωτεϊνών στο ίδιο υπόστρωμα μέσω πολλαπλής λιθογραφίας. Από τα πειράματα πρόσδεσης των παραγώγων της βιοτίνης παρατηρήθηκε ότι ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης προσδένεται ικανοποιητικά στο ΑΜΣ αμινοσιλανίου, ενώ η βιοτίνη προσδένεται σε μικρότερο βαθμό. Η ακινητοποίηση αποδόθηκε σε χημική αντίδραση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με τις αμινομάδες της επιφάνειας. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης δεν προσδέθηκε στο ΑΜΣ αμινοσιλανίου που είχε υποστεί τη λιθογραφία του φωτοευαίσθητου πολυμερικού υμενίου. Μετά από πειράματα επιβεβαιώθηκε ότι το ΑΜΣ του αμινοσιλανίου αντιδρά με το φωτοευαίσθητο υμένιο, κατά το στάδιο της θέρμανσης μετά την επίστρωση (PAB), που είναι το στάδιο που πραγματοποιείται θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (120 °C για 5 min) με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η πρόσδεση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης.

Στη δεύτερη μέθοδο μελετήθηκε η ακινητοποίηση των παραγώγων της βιοτίνης και της βιοτίνης σε φωτοευαίσθητο πολυμερικό υμένιο εποξειδικής ρητίνης. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η τροποποίηση της επιφάνειας και η λιθογραφία πραγματοποιούνται σε ένα σχηματοποιημένο υλικό χωρίς περαιτέρω τροποποίηση με αποτέλεσμα η διεργασία να είναι λιγότερο χρονοβόρα και, επίσης, να μην υπάρχουν προβλήματα μόλυνσης από τη λιθογραφία ενός φωτοευαίσθητου υμενίου, το οποίο τελικά πρέπει να απομακρυνθεί. Η σχηματοποίηση της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης στηρίζεται στη διάνοιξη των εποξειδικών δακτυλίων και στη δημιουργία αιθερο-δεσμών. Προκειμένου να είναι εφικτή η ακινητοποίηση των παραγώγων της βιοτίνης είναι απαραίτητο να υπάρχουν εναπομείνουσες δραστικές εποξειδικές ομάδες. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η λιθογραφική διεργασία και βρέθηκε, μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου, ότι στη λιθογραφικά κρίσιμη δόση η κατανάλωση εποξειδικών δακτυλίων αντιστοιχεί σε

ποσοστό μικρότερο του 15%. Επομένως, υπάρχουν πολλές εναπομείνουσες εποξειδικές ομάδες που μπορούν να αντιδράσουν με τα παράγωγα της βιοτίνης.

Από τα πειράματα ακινητοποίησης των παραγώγων της βιοτίνης βρέθηκε ότι ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης είναι το παράγωγο της βιοτίνης που προσδένεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στη φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη. Επίσης βρέθηκε ότι η πρόσδεση της βιοτίνης είναι μηδενική. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη της χημικής πρόσδεσης της βιοτίνης και αποκλείουν τη φυσική προσρόφησή της στα δείγματα. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης προσδένεται λιγότερο στα εκτεθειμένα υμένια (διασταυρωμένα υμένια) από ότι στο ανέκθετο υμένιο (αρχικό υμένιο). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς με τη διασταύρωση της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης καταναλώνεται μέρος των εποξειδικών δακτυλίων, όπως προαναφέρθηκε. **Με την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου επιτεύχθηκε η ακινητοποίηση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης σε μικροδομές εποξειδικής ρητίνης έως 0.5 μm**, οι οποίες είχαν κατασκευαστεί με λιθογραφία επαφής στο βαθύ υπεριώδες (248 nm) πάνω σε επιφάνεια πυριτίου. Επίσης, σε μικροδομές εποξειδικής ρητίνης έως 0.5 μm ακινητοποιήθηκε το ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης επιβεβαιώνοντας τη δραστηριότητα της εποξειδικής ρητίνης και τη δυνατότητα ακινητοποίησης διαφορετικών βιομορίων ή ουσιών.

Για τη διερεύνηση του μηχανισμού ακινητοποίησης του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης στην εποξειδική ρητίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Φασματοσκοπίας Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy, ToF-SIMS). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Φυσικής του Πανεπιστημίου Jagiellonian στην Κρακοβία της Πολωνίας. Από τα φάσματα μάζας δευτερογενών ιόντων ως προς το χρόνο πτήσης προέκυψε ότι η σουλφονική ομάδα (θραύσμα  $\text{SO}_3\text{H}^-$ ) ακινητοποιείται στην επιφάνεια της εποξειδικής ρητίνης και της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης. Τα εποξειδία αντιδρούν κάτω από πολύ ήπιες συνθήκες λόγω της ύπαρξης τάσης στον εποξειδικό δακτύλιο. **Η αντίδραση του θειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης με την εποξειδική ρητίνη στηρίζεται στη διάνοιξη του εποξειδικού δακτυλίου και στη διάσπαση του δεσμού C-O**. Συγκεκριμένα, η θειϊκή N-υδροξυηλεκτριμιδοομάδα αντιδρά με τον C του εποξειδικού δακτυλίου και η περιέχουσα τη βιοτίνη ομάδα προσδένεται στο οξυγόνο της ομάδας C-O.

Ο δεύτερος στόχος της Διδακτορικής Διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός υλικού, το οποίο να αποτρέπει την προσρόφηση βιολογικού υλικού και να σχηματοποιείται μέσω φωτολιθογραφίας. Για την επίτευξη αυτού του στόχου μελετήθηκαν φωτοευαίσθητα υλικά που βασίζονταν είτε σε εποξειδική ρητίνη EPR είτε σε πολυ(βινυλική αλκοόλη).

Η φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη EPR, δηλαδή η εποξειδική ρητίνη που περιέχει το φωτοευαίσθητοποιητή εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλο-σουλφονίου (Triphenylsulfonium hexafluoroantimonate, TPS), μελετήθηκε σε διάφορες συνθήκες διασταύρωσης (έκθεσης και θέρμανσης PEB). Στα συγκεκριμένα πειράματα ο στόχος, αρχικά, ήταν να δημιουργηθούν όσο το δυνατό λιγότερες υδροξυλομάδες ( $-\text{OH}$ ), οι οποίες δημιουργούνται από την αντίδραση του φωτοπαραγωγού οξέος με την εποξειδική ρητίνη, και να προχωρήσει όσο το δυνατό περισσότερο ο κατιοντικός πολυμερισμός της εποξειδικής ρητίνης, έτσι ώστε στο τελικό υμένιο να υπάρχουν ελάχιστες υδροξυλομάδες ( $-\text{OH}$ ), και μεγάλος αριθμός αιθερικών ομάδων με παράλληλη καταστροφή των εποξειδικών δακτυλίων. Από τα πειράματα προσρόφησης της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βόδς προέκυψε ότι η

πρωτεΐνη προσροφάται αρκετά στα διασταυρωμένα υμένια. Εναλλακτικά διερευνήθηκε η δημιουργία όσο το δυνατόν περισσότερων υδροξυλομάδων (-OH) στο υμένιο. Για να δημιουργηθεί μεγάλος αριθμός -OH χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό φωτοπαραγωγού οξέος TPS. Και σε αυτήν την περίπτωση τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσρόφησης της πρωτεΐνης δεν ήταν τα επιθυμητά, καθώς η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός προσροφάται αρκετά στα διασταυρωμένα υμένια της φωτοευαίσθητης εποξειδικής ρητίνης.

Τα φωτοευαίσθητα υλικά πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA) που μελετήθηκαν στη συνέχεια βασίζονται στη σχηματοποίηση των πολυμερικών υμενίων μέσω της φωτοαναγωγής του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ). Αναλυτικότερα, το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ανάγεται κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε UV προκαλώντας την οξειδωση των υδροξυλομάδων της PVA προς καρβονυλομάδες και στη συνέχεια κατά το στάδιο της θέρμανσης μετά την έκθεση λαμβάνει χώρα αφυδάτωση σε όξινο περιβάλλον και σε υψηλές θερμοκρασίες. Ακολουθώντας, μέσω αντιδράσεων Diels Alder, ενώνονται οι αλυσίδες με αποτέλεσμα τη διασταύρωση της PVA [149]. Η διεργασία αυτή έχει προταθεί στη βιβλιογραφία για την κατασκευή μικροηλεκτρονικών διατάξεων [149, 150]. **Για να εφαρμοστεί η φωτολιθογραφία της PVA στην κατασκευή βιοαναλυτικών διατάξεων ήταν απαραίτητη η τροποποίηση του σταδίου της εμφάνισης, έτσι ώστε σε αυτό το στάδιο να απομακρυνθούν οι ανέκθετες περιοχές αλλά ταυτόχρονα να απομακρυνθεί και το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ από την πολυμερική μήτρα,** καθώς αν το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ παραμείνει στην πολυμερική μήτρα τότε μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα βιομόρια που πρόκειται να ενεποτεθούν. Προκειμένου να επιτευχθεί η απομάκρυνση του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε σε απιονισμένο νερό, σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου και σε διάλυμα μεθανόλης:νερού 1:1 v/v.

Η απομάκρυνση του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος μελετήθηκε με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας υπερύθρου, μέσω των κορυφών στα  $793\text{ cm}^{-1}$ ,  $895\text{ cm}^{-1}$ ,  $977\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1079\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται στην παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος και με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού, μέσω της κορυφής στα 267 nm. Διαπιστώθηκε ότι η πλήρης απομάκρυνση του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος, κατά το στάδιο της εμφάνισης, επιτυγχάνεται είτε με πραγματοποίηση της εμφάνισης σε υδροξείδιο του τετραμεθυλοαμμωνίου, είτε με πραγματοποίηση της εμφάνισης σε διάλυμα μεθανόλης:νερού. Επιλέχθηκε το διάλυμα μεθανόλης:νερού γιατί δεν επηρεάζει σημαντικά τα βιομόρια σε περίπτωση που υπολείμματα του διαλύματος εμφάνισης παρέμεναν στο πολυμερικό υμένιο.

Στα πειράματα επιλεκτικής προσρόφησης πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η επιλογή ενός υποκείμενου υποστρώματος, πάνω στο οποίο θα παραγματοποιηθεί η φωτολιθογραφική σχηματοποίηση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA και στο οποίο θα ακινητοποιούνται οι πρωτεΐνες, μέσω φυσικής προσρόφησης. **Το υποκείμενο υπόστρωμα είναι επιθυμητό να ευνοεί τη φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών, να μην διαλύεται σε υδατικά διαλύματα και να μην επηρεάζεται από τη φωτολιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA.** Ως πιθανά υποστρώματα επιλέχθηκαν να μελετηθούν υμένιο νεολάκας/ διαζωναφθοκινόνης, το AMΣ του 3-αμινοπροπυλο-τριαθοξυσιλανίου (3-Aminopropyl Triethoxysilane, APTES), υμένιο εποξειδικής ρητίνης και υμένιο πολυστυρενίου, στα οποία έχει μελετηθεί η προσρόφηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός [233].

Από πειράματα προσρόφησης και μετρήσεων των γωνιών επαφής βρέθηκε ότι το υμένιο που επηρεαζόταν λιγότερο από τη φωτολιθογραφική διεργασία του

φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA ήταν το υμένιο πολυστυρενίου. Το υμένιο πολυστυρενίου χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα και μετά τη φωτολιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, επιτεύχθηκε η σχηματοποίηση της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός σε δομές μέχρι 2.5  $\mu\text{m}$ . Στις σχηματοποιημένες επιφάνειες παρατηρήθηκε ότι, η βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός δεν προσροφήθηκε στις δομές της διασταυρωμένης PVA, ενώ προσροφήθηκε στο πολυστυρένιο. Επίσης, οι σχηματοποιημένες επιφάνειες εμβαπτίστηκαν για μεγάλους χρόνους επώασης σε διαλύματα βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. Συγκεκριμένα, εμβαπτίστηκαν για 30 min, 1 h, 3 h και 22 h και διαπιστώθηκε ότι, **δεν λαμβάνεται ανιχνεύσιμο σήμα από τις περιοχές της διασταυρωμένης PVA ανεξάρτητα από το χρόνο επώασης**. Παρατηρήθηκε επίσης ότι, η ικανότητα πρόσδεσης του πολυστυρενίου παίρνει την τελική της τιμή μετά από 30 min επώασης στο διάλυμα της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός. **Ο λόγος σήματος για τη βιοτινυλιωμένη οροαλβουμίνη βοός που ακινητοποιείται στο πολυστυρένιο σε σχέση με το αντίστοιχο σήμα που λαμβάνεται από τις δομές του υμενίου PVA είναι 120:1**. Στη συνέχεια, ακινητοποιήθηκε στις σχηματοποιημένες επιφάνειες το αντίσωμα αιγός κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών κουνελιού. Οι σχηματοποιημένες επιφάνειες εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα αντισώματος αιγός κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών κουνελιού για 30 min, 1 h, 3 h και 22 h και διαπιστώθηκε ότι δεν λαμβάνεται ανιχνεύσιμο σήμα από τις περιοχές της διασταυρωμένης PVA ανεξάρτητα από το χρόνο επώασης. Παρατηρήθηκε επίσης ότι, η ικανότητα προσρόφησης στο πολυστυρένιο για το αντίσωμα αιγός κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών κουνελιού παίρνει την τελική της τιμή μετά από 1 h και ότι **ο λόγος σήματος για το αντίσωμα αιγός κατά των  $\gamma$ -σφαιρινών κουνελιού που ακινητοποιείται στο πολυστυρένιο σε σχέση με το αντίστοιχο σήμα που λαμβάνεται από τις δομές του υμενίου PVA είναι 80:1**. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πολύ υψηλή εκλεκτικότητα ακινητοποίησης.

Επειδή το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA επηρέαζε σημαντικά τις ιδιότητες των περισσότερων υποκείμενων υποστρωμάτων (γωνίες επαφής και ικανότητα προσρόφησης) μελετήθηκε η τροποποίηση της σύστασής του. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η αντικατάστασή του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) από το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο ( $(\text{NH}_4)_6(\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62})$ ). Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα υμένιο εποξειδικής ρητίνης, γιατί οι εποξειδικές ομάδες του υμενίου είναι πολύ δραστικές και αντιδρούν ακόμα και κάτω από ήπιες συνθήκες. Το φωτοευαίσθητο διάλυμα PVA που περιείχε το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ, ως φωτοευαίσθητη ουσία, επηρέαζε σημαντικά και τις γωνίες επαφής και την ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών του υμενίου της εποξειδικής ρητίνης. Συγκεκριμένα, η γωνία επαφής του υμενίου εποξειδικής ρητίνης ήταν  $68^\circ$  και μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που περιείχε το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ η γωνία επαφής μειωνόταν στις  $31^\circ$ . Επίσης, η ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών της εποξειδικής ρητίνης μετά την επίστρωση, θέρμανση και εμφάνιση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που περιείχε το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ήταν μηδενική. Αντιθέτως, το φωτοευαίσθητο διάλυμα PVA που περιείχε το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο, ως φωτοευαίσθητη ουσία, δεν επηρέαζε ιδιαίτερα τις γωνίες επαφής και την ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών της εποξειδικής ρητίνης. Από αυτή τη μελέτη συμπεραίνεται ότι, **για τη δημιουργία δομών που αποτρέπουν την προσρόφηση πρωτεϊνών σε δραστικά υποστρώματα ενδείκνυται η χρήση του φωτοευαίσθητου διαλύματος PVA που περιέχει το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο, ως φωτοευαίσθητη ουσία**.



Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σχηματοποίηση κυττάρων εφαρμόζοντας τη φωτοχημική τροποποίηση του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA σε διάφορα υποστρώματα. Οι δομές που απαιτούνται για τη σχηματοποίηση των κυττάρων είναι της τάξης των 10 μm, λόγω του μεγέθους των κυττάρων [104], επομένως, η διεργασία που βασίζεται στη διασταύρωση της PVA είναι κατάλληλη, γιατί ήδη έχει παρουσιαστεί η δυνατότητα σχηματισμού δομών μέχρι 2.5 μm, που είναι πολύ μικρότερες από τις απαιτούμενες δομές. Επιλέχθηκε να σχηματοποιηθούν κύτταρα της καρκινικής σειράς U-87MG, κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12 και φυσιολογικοί ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες.

Τα κύτταρα της καρκινικής σειράς U-87MG που προέρχονται από ανθρώπινο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα, σχηματοποιήθηκαν σε επιφάνειες πυριτίου που περιείχαν δομές διασταυρωμένης PVA. Οι δομές ήταν γραμμές διαφορετικού πλάτους. Από τις σχηματοποιημένες επιφάνειες ήταν ευδιάκριτη η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων στις περιοχές του πυριτίου, ενώ δεν υπήρχαν προσκολλημένα κύτταρα στις περιοχές της διασταυρωμένης PVA ακόμα και μετά από επώαση 96 ωρών. **Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όσο ο χρόνος επώασης αυξάνεται τόσο περισσότερα κύτταρα προσκολλώνται στις περιοχές Si, που σημαίνει ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων δεν παρεμποδίζεται από την τοπογραφία της επιφάνειας και από την παρουσία της διασταυρωμένης PVA.**

Από πειράματα στα οποία δημιουργήθηκαν σχηματοποιημένες επιφάνειες που είχαν γραμμές διασταυρωμένης PVA και γραμμές πυριτίου διαφορετικού πλάτους παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα προσκολλώνται και αναπτύσσονται στις γραμμές με πλάτος ίσο ή μεγαλύτερο από 10 μm. Σε σχηματοποιημένες επιφάνειες με πλάτος γραμμών μικρότερο από 10 μm τα κύτταρα U-87MG δεν εμφανίζουν τόσο μεγάλη επιλεκτικότητα ως προς τις γραμμές πυριτίου επειδή το πλάτος των γραμμών Si δεν είναι επαρκές για την προσκόλληση κυττάρων U-87MG καθώς το μέγεθος ενός κυττάρου U-87MG είναι περίπου 20 μm. **Όταν το εύρος γραμμών πυριτίου είναι 20-25 μm τα κύτταρα U-87MG στις περιοχές Si προσκολλώνται μεμονωμένα, χωρίς να σχηματίζουν συσσωματώματα και συνδέονται εκτείνοντας φιλοπόδια κατά μήκος των γραμμών πυριτίου.** Αυτό οφείλεται στο πλάτος των δομών πυριτίου που έχουν σχηματιστεί με τη λιθογραφία της PVA, το οποίο είναι περίπου ίδιο με το μέγεθος ενός κυττάρου U-87MG. Σε δομές πυριτίου μεγαλύτερες από 45 μm τα κύτταρα εμφανίζουν πολύ μεγάλη επιλεκτικότητα στο πυρίτιο αλλά δεν σχηματίζουν γραμμικές συστοιχίες με τη συνένωση των απολήξεών τους. Επομένως, σε εύρος γραμμών πυριτίου 20 έως 25 μm μπορούν να δημιουργηθούν διατάξεις μεμονωμένων κυττάρων U-87MG σε γραμμικές συστοιχίες.

Από πειράματα προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας που προσκολλώνται στις σχηματοποιημένες επιφάνειες με διαφορετικό πλάτος γραμμών πυριτίου-PVA, καθώς και προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων που προσκολλώνται σε δείγμα πυριτίου και σε δείγμα διασταυρωμένης PVA, παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας στις περιοχές Si των σχηματοποιημένων επιφανειών ήταν σχεδόν ίσος ή μεγαλύτερος σε σχέση με το δείγμα πυριτίου. Επομένως, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε επιφάνειες πυριτίου είναι ίδιος με το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων στις σχηματοποιημένες επιφάνειες. Επομένως, επιβεβαιώνεται ότι τα κύτταρα δεν επηρεάζονται από τη διασταυρωμένη PVA που περιβάλλει τις περιοχές Si στις σχηματοποιημένες επιφάνειες. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι γραμμές της διασταυρωμένης PVA στις σχηματοποιημένες επιφάνειες αποτρέπουν την προσκόλληση κυττάρων U-87MG ικανοποιητικά, ειδικά όταν το πλάτος τους είναι ίσο ή μεγαλύτερο από το μέγεθος των κυττάρων, δηλαδή όταν το πλάτος των

γραμμών της PVA είναι ίσο ή μεγαλύτερο από 20  $\mu\text{m}$ . Τέλος, παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται το πλάτος των γραμμών Si τόσο περισσότερα κύτταρα προσκολλώνται σε αυτές, αποδεικνύοντας την προτίμηση των κυττάρων U-87MG να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν στο Si και όχι στην PVA.

Από πειράματα που αφορούσαν την ευθυγράμμιση των κυττάρων U-87MG στις περιοχές Si, οι οποίες περιβάλλονταν από δομές PVA, βρέθηκε ότι τα κύτταρα ευθυγραμμίζονταν καλά για όλες τις δομές από 10-22.5  $\mu\text{m}$  όπου η πιστότητα προκύπτει μεγαλύτερη από 0.96, ενώ στις μεγαλύτερες δομές, όταν το εύρος γραμμών πυριτίου κυμαίνεται από 40-50  $\mu\text{m}$ , επιτρέπεται στα κύτταρα λόγω του μεγέθους τους να σχηματίσουν μεγαλύτερη γωνία και κατά συνέπεια η πιστότητα μειώνεται κάτω από 0.88. Με βάση τα πειράματα προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας που προσκολλώνται στις δομές πυριτίου και PVA και προσδιορισμού της πιστότητας, συμπεραίνεται ότι η καλύτερη επιλεκτικότητα σε συνδυασμό με την καλύτερα οργανωμένη γραμμική διάταξη των κυττάρων U-87MG επιτεύχθηκε στις γραμμές Si πλάτους 22.5  $\mu\text{m}$ . Επίσης, διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα U-87MG διατηρούνται ευθυγραμμισμένα σε γραμμές Si πλάτους 22.5  $\mu\text{m}$ , ακόμα και μετά από 5 ημέρες καλλιέργειας, παρόλο που συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Σε σχηματοποιημένες επιφάνειες της διασταυρωμένης PVA πάνω σε υμένιο πολυστυρενίου παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα προσκολλώνται επιλεκτικά στις περιοχές του πολυστυρενίου αλλά δεν αποκτούν τη φυσιολογική τους μορφολογία και δεν πολλαπλασιάζονται με φυσιολογικό ρυθμό, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται σποραδικά και όχι σε όλες τις περιοχές του αποκεκαλυμμένου πολυστυρενίου. Από πειράματα για τον προσδιορισμό του σταδίου που επηρεάζει την επιφάνεια του πολυστυρενίου βρέθηκε ότι το πολυστυρένιο επηρεάζεται αρκετά από την εναπόθεση της PVA που δεν περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ (PVA σκέτης) ακολουθώντας όλα τα στάδια της λιθογραφίας, ενώ επηρεάζεται πάρα πολύ όταν ακολουθείται όλη η λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA παρουσία του 12-βολφραμοφωσφορικού οξέος. Παρατηρήθηκε επίσης ότι αν η λιθογραφική διεργασία δεν περιελάμβανε τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB) θα είχε πολύ μικρότερη επίδραση στην επιφάνεια του πολυστυρενίου. Όμως, αυτό δεν είναι εφικτό, καθώς τότε δεν θα ελάμβανε χώρα η διασταύρωση της PVA στις εκτεθειμένες περιοχές.

Από τις παρατηρήσεις αυτές συμπεραίνεται ότι όταν εφαρμόζονται τα στάδια της θέρμανσης (PAB και PEB) της φωτολιθογραφικής διαδικασίας τότε μένουν υπολείμματα PVA πάνω στο υμένιο πολυστυρενίου. Αυτό παρατηρείται εντονότερα όταν επιστρωθεί το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA, δηλαδή το υμένιο της PVA που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ, αλλά παρατηρείται και όταν επιστρωθεί και το υμένιο της σκέτης PVA. Τα υπολείμματα της PVA επηρεάζουν την προσκόλληση των κυττάρων, ενώ δεν επηρεάζουν την προσρόφηση των πρωτεϊνών, όπως συζητήθηκε προηγουμένως. Τα υπολείμματα αυτά μπορούν να αποδοθούν στην αφυδάτωση της PVA η οποία λαμβάνει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία (θερμάνσεις που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της λιθογραφικής διεργασίας: PAB στους 70 °C για 1 min και PEB στους 88 °C για 3 min). Η αφυδάτωση αυτή είναι εντονότερη παρουσία οξέος, δηλαδή όταν υπάρχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ στην πολυμερική μήτρα. Οι αλυσίδες της αφυδατωμένης PVA περιέχουν διπλούς δεσμούς οι οποίοι πιθανώς βοηθούν στην ακινητοποίησή τους μέσω φυσικής προσρόφησης στο υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου. Το γεγονός ότι τα υπολείμματα της PVA επηρεάζουν την προσκόλληση των κυττάρων στο υποκείμενο υμένιο πολυστυρενίου, ενώ δεν επηρεάζουν την προσρόφηση των πρωτεϊνών, μπορεί να αποδοθεί σε

ενδεχόμενη εκρόφηση των προσροφημένων αλυσίδων PVA με παράλληλη προσρόφηση της πρωτεΐνης στο υμένιο πολυστυρενίου στην περίπτωση επώασης σε διάλυμα πρωτεϊνών, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία [61]. Η εκρόφηση των προσροφημένων αλυσίδων PVA από το υμένιο του πολυστυρενίου είναι αδύνατη όταν η επιφάνεια εμβαπτίζεται στο θρεπτικό υλικό που περιέχει τα κύτταρα, με αποτέλεσμα αυτά να μην προσκολλώνται στο πολυστυρένιο που έχει υποστεί τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ως φωτοευαίσθητοποιητή.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σχηματοποίησης κυττάρων που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά PC-12. Επειδή τα κύτταρα της σειράς PC-12 δεν προσκολλώνται σε επιφάνειες Si, έγινε προσπάθεια να προσκολληθούν σε επιφάνειες Si και σε επιφάνειες πολυστυρενίου που είχαν τροποποιηθεί με κολλαγόνο και βρέθηκε ότι τόσο τα αδιαφοροποίητα όσο και τα διαφοροποιημένα κύτταρα PC-12 προσκολλώνται στις επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με κολλαγόνο. Τα κύτταρα PC-12 διαφοροποιούνται μετά την προσθήκη νευρικού αυξητικού παράγοντα. Αξιοποιώντας τα υποστρώματα που είχαν τροποποιηθεί με κολλαγόνο δημιουργήθηκαν δομές διασταυρωμένης PVA και επιτεύχθηκε η σχηματοποίηση των κυττάρων PC-12.

**Στις σχηματοποιημένες επιφάνειες βρέθηκε ότι τα κύτταρα PC-12 προσκολλώνται επιλεκτικά στις αποκεκαλυμμένες περιοχές του πυριτίου-κολλαγόνου και του πολυστυρενίου-κολλαγόνου έναντι των περιοχών της διασταυρωμένης PVA.** Επίσης, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και η βιωσιμότητα των κυττάρων PC-12 που είχαν προσκολληθεί στις σχηματοποιημένες επιφάνειες ήταν συγκρίσιμος με αυτόν που παρατηρείται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία Petri. Η επιφάνεια του πολυστυρενίου δεν επηρεαζόταν από τη λιθογραφική διεργασία του φωτοευαίσθητου υμενίου της PVA, γιατί υπήρχε ένα υμένιο κολλαγόνου ανάμεσα στα δύο στρώματα, το οποίο δεν επηρεάζεται τόσο πολύ από τη λιθογραφική διεργασία της PVA όσο επηρεάζεται το πολυστυρένιο όταν έρχεται σε άμεση επαφή με το φωτοευαίσθητο υμένιο της PVA που περιέχει το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ. **Από πειράματα παρατηρήθηκε ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα PC-12 προσκολλώνται με μεγάλη επιλεκτικότητα πάνω στις τροποποιημένες με κολλαγόνο γραμμές Si και εκτείνουν νευρίτες ακριβώς πάνω σε αυτές, παρουσιάζοντας πολύ καλή γραμμική διάταξη ακόμα και σε εύρος γραμμών ίσο με 10  $\mu\text{m}$ .** Η διάταξη των κυττάρων PC-12 σε μικρότερο εύρος γραμμών από ότι τα U-87MG οφείλεται στο μικρότερο μέγεθός τους.

Τέλος, σχηματοποιήθηκαν ινοβλάστες από ανθρώπινο ιστό δέρματος. Οι ινοβλάστες έχουν απομονωθεί μετά από έγκριση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”. Οι ινοβλάστες στις σχηματοποιημένες επιφάνειες προσκολλήθηκαν σε γραμμές Si, ενώ δεν προσκολλήθηκαν στις δομές διασταυρωμένης PVA. **Οι ινοβλάστες παρουσιάζονται κατευθυνόμενοι σε μια γραμμική διάταξη στις σχηματοποιημένες επιφάνειες με εύρος γραμμών 22.5  $\mu\text{m}$ ,** ενώ σε μεγαλύτερο πλάτος γραμμών πυριτίου εμφανίζουν και πάλι μεγάλη επιλεκτικότητα ως προς το πυρίτιο, αλλά δεν είναι τόσο κατευθυνόμενοι. **Από πειράματα βρέθηκε ότι, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού καθώς και η βιωσιμότητα των ινοβλαστών, που είχαν προσκολληθεί στις σχηματοποιημένες επιφάνειες, είναι συγκρίσιμος με αυτόν που παρατηρείται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία Petri.** Επομένως, οι σχηματοποιημένες επιφάνειες μπορούν να αξιοποιηθούν για την επιλεκτική προσκόλληση φυσιολογικών κυττάρων, στα οποία

μπορούν να πραγματοποιηθούν βιολογικές μελέτες, οι οποίες αφορούν τον κυτταρικό κύκλο, τη γήρανση καθώς και άλλες διαδικασίες.

## Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 1. Σύνθεση των ακρυλικών τετραπολυμερών

Τα δύο ακρυλικά τετραπολυμερή PHETIMA 1 και PHETIMA 2 που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία συντέθηκαν από τον Δρ. Κ. Διακουμάκο, μέσω της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφεται παρακάτω [174, 175].

Σε μία τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL εφοδιασμένη με ένα μηχανικό αναδευτήρα, ένα θερμομέτρο ελέγχου θερμοκρασίας, μία είσοδο N<sub>2</sub>, ένα ψυκτήρα Graham εξοπλισμένο με ένα ψυκτικό δακτύλιο που χρησιμοποιεί ψυχρό νερό ως ψυκτική παγίδα, μία σταγονομετρική χοάνη και ένα θερμαντικό μανδύα, εισάγονται 25g ξυλολίου και θερμαίνονται με παράλληλη ψύξη με αντirroή. Διάλυμα που αποτελείται από το μίγμα των τεσσάρων μονομερών HEMA, IBMA, TBMA, AA (30g μεθακρυλικό 2-υδροξυαιθυλμετακρυλένιο (2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA), 40g μεθακρυλικό ισοβορνυλικό εστέρα (isobornyl methacrylate, IBMA), 20g μεθακρυλικό τριτοταγή βουτυλεστέρα (t-butyl methacrylate, TBMA), 10g ακρυλικό οξύ (acrylic acid, AA)), 3g του απαρχιτή 2,2'-αζωδι-(2-μεθυλοβουτυρονιτρίλιο) (AMBN), 3g του αντιδραστηρίου τερματισμού 2-μερκαπτοαιθανόλη και 25g ξυλολίου, προστίθεται στάγδην, στη φιάλη μέσα σε περίοδο 3 h με ταυτόχρονη ανάδευση και θέρμανση στους 140 °C. Όταν ολοκληρωθεί η εισαγωγή του διαλύματος, προστίθενται άλλα 3g AMBN, και η ψύξη με αντirroή συνεχίζεται επί 1 h. Το μίγμα που λαμβάνεται αποχύνεται σε 400 mL πετρελαϊκό αιθέρα (μη διαλύτης) και αναδεύεται επί 3 h. Το λευκό ίζημα που σχηματίζεται φιλτράρεται, εκπλένεται προσεκτικά με πετρελαϊκό αιθέρα και ξηραίνεται σε φούρνο κενού στους 50 °C επί 24 h, για να ληφθεί, τελικά, το τετραπολυμερές PHETIMA 1 (λευκό στερεό, απόδοση ~99%). Η ίδια πειραματική πορεία πολυμερισμού με μηχανισμό ριζών ακολουθείται και για τη σύνθεση του τετραπολυμερούς PHETIMA 2 με την προσθήκη των κατάλληλων ποσοστίων των μονομερών.

### 2. Παρασκευή 18-βολφραμοδιφωσφορικού αμμωνίου ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>)

Η διεργασία για την παρασκευή του 18-βολφραμοδιφωσφορικού αμμωνίου ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>) πραγματοποιήθηκε από τον Δρ. Α. Δούβα, ο οποίος εργάζεται στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”. Η ουσία αυτή παρασκευάζεται με τη μέθοδο που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [242].

### 3. Διεργασία για την παρασκευή της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός

Η διεργασία για την παρασκευή της βιοτινυλιωμένης οροαλβουμίνης βοός πραγματοποιείται από την Ερευνήτρια Β' Βαθμίδας Π. Πέτρου, η οποία εργάζεται στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”.

Αρχικά διαλύεται 1 mg οροαλβουμίνη βοός σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών ιόντων συγκέντρωσης 0.05 M και pH 9 και προστίθενται στάγδην 20 μLθειϊκού N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρα της βιοτίνης (NHS-LC-biotin), ο οποίος είναι διαλυμένος σε διμεθυλοφορμαμίδιο σε συγκέντρωση 100 mg/mL. Τα αντιδρώντα αναδεύονται επί 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετείται σε μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης με σκοπό να ληφθεί η βιοτινυλιωμένη

οροαλβουμίνη βοός και να απομακρυνθεί ο θειϊκός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης που δεν αντέδρασε.

#### **4. Διεργασίες για την ακινητοποίηση και τη χρώση των κυττάρων**

Οι διεργασίες της ακινητοποίησης και της χρώσης των κυττάρων καθώς και η τροποποίηση της επιφάνειας του Si με κολλαγόνο πραγματοποιήθηκαν από την Δρ. Α. Μπούρκουλα, η οποία εργάζεται στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”.

##### **4.1. Διεργασία για την ακινητοποίηση καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς U-87MG που προέρχονται από ανθρώπινο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα**

Τα καρκινικά κύτταρα της σειράς U-87MG που προέρχονται από ανθρώπινο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα επωάζονται σε φιάλες κυτταροκαλλιέργειας με θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% κ.β. εμβρυϊκό ορό βοός, 1% κ.β. L-γλουταμίνη και 1% κ.β. πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας με χρήση διαλύματος 0.025% κ.ό. θρυψίνης/EDTA και επωάζονται για 5 min σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub>). Οι προς εξέταση επιφάνειες αποστειρώνονται με εμβάπτιση για 3 min σε απόλυτη αιθανόλη και μεταφέρονται σε τρυβλία Petri (Petri dishes). Ακολουθεί σπορά 4\*10<sup>4</sup> κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες που έχουν εμβαδόν 1\*1 cm<sup>2</sup> και σε δείγματα ελέγχου (τρυβλία Petri) σε στείρες συνθήκες μέσα σε κλίβανο κάθετης νηματικής ροής. Στη συνέχεια, τα κύτταρα στα δείγματα καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub>) για το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την κάθε μελέτη. Σε όλα τα δείγματα το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται κάθε 2 ημέρες. Μετά το πέρας της καλλιέργειας οι επιφάνειες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με σκοπό να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα. Ακολουθεί παρατήρηση των επιφανειών σε οπτικό μικροσκόπιο και αξιολογείται η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων καθώς και η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους.

##### **4.2. Χρώση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των κυττάρων U-87MG**

Τα δείγματα στο τέλος της καλλιέργειας των κυττάρων U-87MG εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με σκοπό την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων νεκρών κυττάρων. Έπειτα, τα κύτταρα μονιμοποιούνται πάνω στις επιφάνειες με εμβάπτιση αυτών για 20 min σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (paraformaldehyde, PFA) 4% κ.β. Κατόπιν, τα δείγματα εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (εμβάπτιση επί 5 min κάθε φορά). Έπειτα, τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα 0.1% κ.ό. Triton X-100 διαλυμένο σε διάλυμα κορεσμού (5% οροαλβουμίνη βοός σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων) για 1 h με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της όξινης ινιδιακής πρωτεΐνης των γλοιοκυττάρων (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) επισημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία κυανίνη 3 (Cy3) τελικής συγκέντρωσης 1.5 µg/mL διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Μέσω του μονοκλωνικού αντισώματος anti-GFAP ανιχνεύεται η πρωτεΐνη GFAP που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων U-87MG, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται η χρώση του

κυτταροπλάσματος των κυττάρων U-87MG. Ακολουθεί εμβάπτιση για 5 min σε 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI) τελικής συγκέντρωσης 50 ng/mL διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με σκοπό τη χρώση του πυρήνα, καθώς η ουσία αυτή προσδένεται στο DNA. Συγκεκριμένα, το DAPI προσδένεται στις περιοχές του DNA που περιέχουν σε υψηλό ποσοστό τις συμπληρωματικές βάσεις αδερίνη-θυμίνη. Έπειτα οι επιφάνειες εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 3 φορές για 5 min κάθε φορά. Στη συνέχεια, μεταφέρονται οι επιφάνειες σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου και προστίθεται μία σταγόνα παραφαινυλοδιαμίνης (p-Phenylenediamine, PPD), η οποία παρεμποδίζει τη γρήγορη εξασθένηση της έντασης φθορισμού. Τέλος, εναποτίθεται πάνω στα δείγματα καλυπτρίδα και παρατηρούνται οι επιφάνειες στο μικροσκόπιο φθορισμού.

### **4.3. Διεργασία για την ακινητοποίηση του κολλαγόνου**

Προκειμένου να προσκολληθούν στις υπό εξέταση επιφάνειες τα κύτταρα της καρκινικής σειράς PC-12 που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου είναι απαραίτητη η ύπαρξη κολλαγόνου, γιατί τα κύτταρα της συγκεκριμένης καρκινικής σειράς καλλιεργούνται και πολλαπλασιάζονται σε εναιώρημα. Επομένως, τα δισκία πυριτίου και τα υμένα πολυστυρενίου προεπωάζονται με κολλαγόνο. Συγκεκριμένα τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 12 h σε διάλυμα κολλαγόνου τελικής συγκέντρωσης 100 µg/mL διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Στην περίπτωση των δισκίων πυριτίου έχει προηγηθεί τροποποίηση της επιφάνειας με 3-αμινοπροπυλο-τριαθοξυσιλάνιο (3-Aminopropyl Triethoxysilane, APTES), όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο B.3.2. Μετά το πέρας των 12 h οι επιφάνειες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και στεγνώνονται σε ρεύμα N<sub>2</sub>.

### **4.4. Διεργασία για την ακινητοποίηση καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς PC-12 που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου**

Τα καρκινικά κύτταρα της σειράς PC-12 που προέρχονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου καλλιεργούνται σε φιάλες κυτταροκαλλιέργειας με θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 5% κ.ό. εμβρυϊκό ορό βοός, 10% κ.ό. ορό αλόγου, 1% κ.ό. γλουταμίνη και 1% κ.ό. πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη. Οι προς εξέταση επιφάνειες αποστειρώνονται με εμβάπτιση για 3 min σε απόλυτη αιθανόλη και μεταφέρονται σε τρυβλία Petri. Οι προς εξέταση επιφάνειες και τα δείγματα αναφοράς (τρυβλία Petri) έχουν προεπωαστεί με κολλαγόνο με βάση τη διεργασία που έχει περιγραφεί στο Παράρτημα E.4.3. Ακολουθεί σπορά  $3 \cdot 10^4$  κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες που έχουν εμβαδόν  $1 \cdot 1 \text{ cm}^2$  και στα δείγματα ελέγχου (τρυβλία Petri) σε στείρες συνθήκες μέσα σε κλίβανο κάθετης νηματικής ροής. Στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% κ.ο CO<sub>2</sub>) για το χρονικό διάστημα που απαιτεί η κάθε μελέτη. Έπειτα από 5 ημέρες αφαιρείται το θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 5% κ.ό. εμβρυϊκό ορό βοός, 10% κ.ό. ορό αλόγου, 1% κ.ό. γλουταμίνη και 1% κ.ό. πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη και προστίθεται νέο με την ίδια σύσταση, το οποίο όμως περιέχει και 100 ng/mL νευρικού αυξητικού παράγοντα (Nerve Growth Factor, NGF). Με την προσθήκη του νευρικού αυξητικού παράγοντα τα κύτταρα της σειράς PC-12 σταματάνε να πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να διαφοροποιούνται. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται κάθε 2 μέρες με νέο της ίδιας σύστασης. Μετά το πέρας της καλλιέργειας οι επιφάνειες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων

συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με σκοπό να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα. Ακολουθεί παρατήρηση των επιφανειών σε οπτικό μικροσκόπιο.

#### **4.5. Χρώση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των διαφοροποιημένων κυττάρων PC-12**

Τα δείγματα στο τέλος της καλλιέργειας των κυττάρων PC-12 εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με σκοπό την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων νεκρών κυττάρων. Έπειτα, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με επώαση επί 20 min σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (paraformaldehyde, PFA) 4% κ.β. Κατόπιν, τα δείγματα με τα μονιμοποιημένα κύτταρα εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (εμβάπτιση 5 min τη φορά). Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται επί 1 h με διάλυμα Triton X-100 (0.1% κ.ό. Triton X-100 διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 5% οροαλβουμίνη βοός). Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται επί 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της συσχετιζόμενης με τους μικροσωλινίσκους πρωτεΐνης 2 (Microtubule-Associated Protein 2, MAP-2) επισημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία Alexa fluor 488 σε τελική συγκέντρωση 2 µg/mL διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Με τη χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος ανιχνεύονται οι μικροσωλινίσκοι του κυτταροπλάσματος των κυττάρων PC-12 που περιέχουν την πρωτεΐνη MAP-2. Γίνεται έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων και ακολουθεί εμβάπτιση των δειγμάτων επί 5 min σε 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI) τελικής συγκέντρωσης 50 ng/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με αποτέλεσμα τη χρώση του πυρήνα. Έπειτα οι επιφάνειες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 3 φορές επί 5 min κάθε φορά. Στη συνέχεια, οι επιφάνειες μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου και προστίθεται μία σταγόνα παραφαινυλοδιαμίνης (p-Phenylenediamine, PPD). Τέλος, εναποτίθεται καλυπτρίδα και παρατηρούνται οι επιφάνειες στο μικροσκόπιο φθορισμού.

#### **4.6. Διεργασία για την ακινητοποίηση ινοβλαστών**

Οι ινοβλάστες απομονώθηκαν και ελήφθησαν από το Ινστιτούτο Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος” από τον Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας Δρ. Δ. Κλέτσα. Οι ινοβλάστες έχουν απομονωθεί μετά από έγκριση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”. Οι ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος καλλιεργούνται σε φιάλες κυτταροκαλλιέργειας με θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο περιέχει 10% κ.ό. εμβρυϊκό ορό βοός, 1% κ.ό. L-γλουταμίνη και 1% κ.ό. πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας με χρήση διαλύματος 0.025% κ.ό. θρυψίνης/EDTA και επωάζονται επί 5 min σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% κ.ο. CO<sub>2</sub>). Οι προς εξέταση επιφάνειες απολυμαίνονται με εμβάπτιση για 3 min σε απόλυτη αιθανόλη και μεταφέρονται σε τρυβλία Petri. Ακολουθεί σπορά 10<sup>4</sup> κυττάρων στις υπό εξέταση επιφάνειες που έχουν εμβαδόν 1\*1 cm<sup>2</sup> και σε δείγματα ελέγχου (τρυβλία Petri) σε στείρες συνθήκες μέσα σε κλίβανο κάθετης νηματικής ροής. Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% κ.ό. CO<sub>2</sub>) για το χρονικό διάστημα που απαιτεί η κάθε μελέτη. Μετά το πέρας της καλλιέργειας οι επιφάνειες εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με σκοπό να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα νεκρά κύτταρα. Ακολουθεί



παρατήρηση των επιφανειών σε οπτικό μικροσκόπιο και αξιολογείται η επιλεκτική προσκόλληση των κυττάρων καθώς και η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους.

#### **4.7. Χρώση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των ινοβλαστών**

Τα δείγματα στο τέλος της καλλιέργειας των ινοβλαστών εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με σκοπό την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων νεκρών κυττάρων. Έπειτα τα κύτταρα μονιμοποιούνται με εμβάπτιση των επιφανειών για 20 min σε διάλυμα 4% κ.β. παραφορμαλδεΐδης (paraformaldehyde, PFA). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται για 1 h με διάλυμα Triton X-100 (0.1% κ.ό. Triton X-100 διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που περιέχει 5% οροαλβουμίνη βοός). Έπειτα, τα δείγματα εμβαπτίζονται 3 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (εμβάπτιση 5 min τη φορά) με σκοπό να απομακρυνθούν τα μη μονιμοποιημένα κύτταρα. Κατόπιν, τα κύτταρα επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού εναντίον της τουμπουλίνης σε τελική συγκέντρωση 1 µg/mL διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται για 2 h με το διάλυμα του αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού επισημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία Alexa Fluor 546 τελικής συγκέντρωσης 10 µg/mL διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Το αντίσωμα ποντικού κατά της τουμπουλίνης προσδένεται στην τουμπουλίνη που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα των ινοβλαστών και στη συνέχεια το αντίσωμα ποντικού κατά της τουμπουλίνης ανιχνεύεται μέσω του αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Ακολουθεί εμβάπτιση για 5 min σε 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη (4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI) τελικής συγκέντρωσης 20 ng/mL διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 10 mM και pH 7 με αποτέλεσμα τη χρώση του πυρήνα. Έπειτα, οι επιφάνειες εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 3 φορές επί 5 min κάθε φορά. Στη συνέχεια, μεταφέρονται οι επιφάνειες σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου και προστίθεται μία σταγόνα παραφαινολοδιαμίνης (p-Phenylenediamine, PPD). Τέλος, εναποτίθεται καλυπτρίδα και παρατηρούνται οι επιφάνειες στο μικροσκόπιο φθορισμού.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA	Acrylic acid, Ακρυλικό οξύ
AFM	Atomic Force Microscope, Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων
Ala, A	Alanine, Αλανίνη
AMBN	2,2'-azobis(2-methylbutyronitrile), 2,2'-αζωδι-(2-μεθυλοβουτυρονιτρίλιο)
APTES	3-Aminopropyl Triethoxysilane, 3-αμινοπροπυλο-τριαθοξυσιλάνιο
Arg, R	Arginine, Αργινίνη
Asn, N	Asparagine, Ασπαραγίνη
Asp, D	Aspartate or Aspartic acid, Ασπαρτικό οξύ
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization, Πολυμερισμός με μηχανισμό ελευθέρων ριζών
BSA	Bovine Serum Albumin, Οροαλβουμίνη βόας
Cys, C	Cysteine, Κυστεΐνη
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol, 4,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη
DMF	Dimethylformamide, Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Dimethyl sulfoxide, Διμεθυλο-σουλφοξειδίο
DUV	Deep Ultraviolet, Βαθύ υπεριώδες
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο-καρβοδιϊμίδιο)
EDTA	Ethylene-Diamino-Tetraacetic acid, Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EL	Ethyl-Lactate, Γαλακτικός αιθυλεστέρας
EPR	Epoxy Resist, Φωτοευαίσθητη εποξειδική ρητίνη
EUV	Extreme Ultraviolet, Ακραίο υπεριώδες
FITC	Fluorescein isothiocyanate, Ισοθειοκυανικό άλας της φθορεσκεΐνης
GFAP	Glial fibrillary acidic protein, Όξινη ινιδιακή πρωτεΐνη των γλοιοκυττάρων
Gln, Q	Glutamine, Γλουταμίνη

Glu, E	Glutamate or Glutamic acid, Γλουταμικό οξύ
Gly, G	Glycine, Γλυκίνη
GMBS	N-γ-maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester, γ-μαλεϊδοβουτυρικός-N-ηλεκτριμιδοεστέρας
HEMA	2-hydroxyethyl methacrylate, μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας
His, H	Histidine, Ιστιδίνη
HMDS	Hexamethyldisilazane, Εξαμεθυλοδιισιλαζάνη
IBMA	Isobornyl methacrylate, μεθακρυλικός ισοβορνυλικός εστέρας
Ile, I	Isoleucine, Ισολευκίνη
Leu, L	Leucine, Λευκίνη
lift-off	Η τεχνική της αποκόλλησης
Lys, K	Lysine, Λυσίνη
MA	Methacrylic acid, Μεθακρυλικό οξύ
MAP-2	Microtubule-associated protein 2, Συσχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη 2
MEMS	MicroElectroMechanical Systems or microelectronic and microelectromechanical systems, Μικροηλεκτρομηχανικά συστήματα
Met, M	Methionine, Μεθειονίνη
MHA	16-mercaptohexadecanoic acid, 16-μερκαπτοεξαδεκανοϊκό οξύ
MIBK	Methyl Isobutyl Ketone, Μεθυλο-Ισοβουτυλο-Κετόνη
MUA	Mercaptoundecanoic Acid, Μερκαπποδεκανοϊκό Οξύ
NGF	Nerve Growth Factor, Νευρικός αυξητικός παράγοντας
NHS εστέρας της βιοτίνης	Sulfosuccinimidyl-6-biotin-amido hexanoate, 6-βιοτινάμιδο εξανοϊκός θειικός ηλεκτριμιδοεστέρας ή θειικός N-υδροξυηλεκτριμιδοεστέρας της βιοτίνης
NMP	Nitroxide Mediated Polymerization, Πολυμερισμός με τη διαμεσολάβηση νιτροξειδίου
OEGMA	Oligo(ethylene glycol) methacrylate, Μεθακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης
OTS	n-Octadecyltrichlorosilane, n-οκταδεκυλοτριχλωροσιλάνιο
PAA	Poly(acrylic acid), πολυ(ακρυλικό οξύ)

PAB	Post Applied Bake, Θέρμανση μετά την επίστρωση
PAG	Photo-Acid Generator, Φωτο-παραγωγός οξέος
PDMS	Poly(dimethyl siloxane), πολυ(διμεθυλο σιλοξάνη)
PEB	Post Exposure Bake, Θέρμανση μετά την έκθεση
PEG	Polyethylene glycol, πολυ(αιθυλενογλυκόλη)
PEI	Poly(ethylenimine), πολυ(αιθυλενιμίνη)
PET	Poly(ethylene terephthalate), πολυ(αιθυλενο τereφθαλικός εστέρας)
PFA	Paraformaldehyde, παραφορμαλδεΐδη
PGMEA	Propylene Glycol Methyl Ether Acetate, Οξικός εστέρας του μεθυλαιθέρα της προπυλενογλυκόλης
Phe, F	Phenylalanine, Φαινυλαλανίνη
PHETIMA τετραπολυμερή	Poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-t-butyl methacrylate-co-isobornyl methacrylate-co-acrylic acid), πολυ(μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας-co- μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας-co-μεθακρυλικός ισοβορνυλικός εστέρας-co-ακρυλικό οξύ)
PLL	Poly-L-lysine, πολυ-L-λυσίνη
PMMA	Poly(methyl methacrylate), πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)
PNHSMA	Poly(N-succinimidyl methacrylate), μεθακρυλικός N-ηλεκτριμιδοεστέρας
PPD	p-Phenylenediamine, παραφαινοδιαμίνη
Pro, P	Proline, Προλίνη
PS	Polystyrene, πολυστυρένιο
PSP-DPS	Phenylthiophenyl-diphenyl sulfonium hexafluoroantimonate, Εξαφθοροαντιμονικό άλας του φαινυλθειοφαινολο διφαινολοσουλφονίου
PTBA	Poly(tert-butylacrylate), πολυ(ακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας)
PTBMA	Poly(t-butyl methacrylate, πολυ(μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας)
PT-BOCST	Poly(tert-butoxycarbonyloxystyrene), πολυ(τριτοταγής-βουτοξυκαρβονυλοξυστυρένιο)
p-TsOH	p-Toluenesulfonic acid, p-Τολουολοσουλφονικό οξύ
PVA	Poly(vinyl alcohol), πολυ(βινυλική αλκοόλη)

RAFT	Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization, Αντριστρεπτή προσθήκη-σπάσιμο αλυσίδας πολυμερισμού
RGD	Arginine (R)- Glycine (G)- Aspartic Acid (D), Αργινίνη-Γλυκίνη-Ασπαρτικό οξύ
rms τραχύτητα	Root mean square roughness, η μέση τετραγωνική ρίζα της τραχύτητας
ROMP	Ring-opening Metathesis Polymerization, πολυμερισμός με μηχανισμό μετάθεσης σχάσης δακτυλίου
ROP	Ring-opening Polymerization, πολυμερισμός με μηχανισμό σχάσης δακτυλίου
SAMs	Self-Assembly Monolayers, Αυτοοργανωμένα Μονομοριακά Στρώματα (ΑΜΣ)
SEM	Scanning Electron Microscope, Μικροσκόπιο Σάρωσης Ηλεκτρονίων
Ser, S	Serine, Σερίνη
SIMs	Secondary Ion Mass Spectroscopy, Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων
SIP	Surface-Initiated Polymerization, Πολυμερισμός που εκκινείται από την Επιφάνεια
SPR	Surface Plasmon Resonance, Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων
SU-8	Glycidyl ether of bisphenol A, η εποξειδική ρητίνη γλυκιδικός αιθέρας της διφαινόλης Α
TBMA	t-butyl methacrylate, μεθακρυλικός τριτοταγής βουτυλεστέρας
Thr, T	Threonine, Θρεονίνη
TMAH	Tetramethylammonium hydroxide, Υδροξειδίο του τετραμεθυλοαμμωνίου
ToF-SIMs	Time of Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy, Φασματοσκοπία Μάζας Δευτερογενών Ιόντων ως προς το Χρόνο Πτήσης
TPS	Triphenylsulfonium hexafluoroantimonate, Εξαφθοροαντιμονικό άλας του τριφαινυλοσουλφωνίου
Trp, W	Tryptophan, Θρυπτοφάνη ή Τρυπτοφάνη
Tween-20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Μονολαυρικός εστέρας της πολυοξοαιθυλενοσορβιτόλης
Tyr, Y	Tyrosine, Τυροσίνη
UV-VIS	Ultraviolet –Visible, Υπεριώδες-Ορατό
Val, V	Valine, Βαλίνη
μCP	Microcontact printing, Εγγραφή με μικροεπαφή
Παράγωγο της βιοτίνης με αμινομάδα	Biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine, βιοτινιλο-3,6-διοξοοκτανοδιαμίνη

ΠΟΜ

πολυοξομεταλλικές ενώσεις, στην παρούσα διδακτορική διατριβή ως ΠΟΜ αναφέρεται το 12-βολφραμοφωσφορικό οξύ ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), ενώ ως ΠΟΜ άλας αναφέρεται το 18-βολφραμοδιφωσφορικό αμμώνιο  $(NH_4)_6(P_2W_{18}O_{62})$





## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anderson J.M., *Ann. Rev. Mater. Res.* 31 (2001) 81.
2. Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T., *Seminars in Immunology* 20 (2008) 86.
3. Ikada Y., In "Polymers of Biological and Biomedical Significance", Chapter 3, Interfacial Biocompatibility, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, (1993).
4. Κλώνης Ι., "Ενζυμική Βιοτεχνολογία", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2010).
5. Goddard J.M., Talbert J.N., Hotchkiss J.H., *J. Food Sci.* 72 (2007) E36.
6. Appendini P., Hotchkiss J.H., *Packag. Technol. Sci.* 10 (1997) 271.
7. Mrksich M., *Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 653.
8. Mrksich M., Whitesides G.M., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25 (1996) 55.
9. Jo S., Park K., *Biomaterials* 21 (2000) 605.
10. Onclin S., Ravoo B.J., Reinhoudt D.N., *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 6282.
11. Chiari M., Cretich M., Damin F., Di Carlo G., Oldani C., *Journal of Chromatography B* 866 (2008) 89.
12. Ottenbrite R. M., Fadeeva N., In "Polymeric Drugs and Drug Administration", Chapter 1, ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC, (1994).
13. Chen H., Yuan L., Song W., Wu Z., Li D., *Progress in Polymer Science* 33 (2008) 1059.
14. Sagiv J., *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 92.
15. Nuzzo R. G., Allara D. L., *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4481.
16. Mathieu, M., Hartmann, N., *New Journal of Physics* 12 (2010) art. no. 125017.
17. Ulman A., *Chem. Rev.* 96 (1996) 1533.
18. Flink S., Van Veggel F.C.J.M., Reinhoudt D.N., *J. Phys. Org. Chem.* 14 (2001) 407.
19. Moon J.H., Shin J.W., Kim S.Y., Park J.W., *Langmuir* 12 (1996) 4621.
20. Moon J.H., Kim J.H., Kim K., Kang T.H., Kim B., Kim C.H., Hahn J.H., Park J.W., *Langmuir* 13 (1997) 4305.
21. Herzer N., Hoepfener S., Schubert U. S., *Chem. Commun.* 46 (2010) 5634.
22. McGovern, M. E., Kallury, K. M. R., Thompson, M., *Langmuir* 10 (1994) 3607.
23. Silberzan, P., Léger, L., Ausserré, D., Benattar, J. J., *Langmuir* 7 (1991) 1647.
24. Gao W., Reven, L., *Langmuir* 11 (1995) 1860.
25. Norrman K., Ghanbari-Siahkali A., Larssen N.B., *Annual Reports of Chemistry-Section C* 101 (2005) 174.
26. Spangler L.L., Torkelson J.M., Royal J. S., *Polymer Engineering and Science* 30 (1990) 644.
27. Brinks M.K., Studer A., *Macromol. Rapid Commun.* 30 (2009) 1043.
28. Zhao B., Brittain W. J., *Prog. Polym. Sci.* 25 (2000) 677.
29. Haensch C., Ott C., Hoepfener S., Schubert U.S., *Curr. Nanosci.* 6 (2010) 275.
30. Heise A., Menzel H., Yim H., Foster M. D., Wieringa R. H., Schouten J., Erb V., Stamm M., *Langmuir* 13 (1997) 723.
31. Choi I. S., Langer R., *Macromolecules* 34 (2001) 5361.
32. Yoon K. R., Chi Y. S., Lee K.-B., Lee J. K., Kim D. J., Koh Y.-J., Joo S.-W., Yund W. S., Choi I. S., *J. Mater. Chem.* 13 (2003) 2910.
33. Jeon N. L., Choi I. S., Whitesides G. M., Kim N. Y., Laibinis P. E., Harada Y. Y., Finnie K. R., Girolami G. S., Nuzzo R. G., *Appl. Phys. Lett.* 75 (1999) 4201.
34. Kim N. Y., Jeon N. L., Choi I. S., Takami S., Harada Y., Finnie K. R., Girolami G. S., Nuzzo R. G., Whitesides G. M., Laibinis P. E., *Macromolecules* 33 (2000) 2793.
35. Liu X., Guo S., Mirkin C. A., *Angew. Chem., Int. Ed.* 42 (2003) 4785.
36. Lee W.-K., Caster K. C., Kim J., Zauscher S., *Small* 2 (2006) 848.
37. Heeb R., Bielecki R. M., Lee S., Spencer N. D., *Macromolecules* 42 (2009) 9124.
38. Santer S., Kopyshv A., Yang H.-K., Ruehe J., *Macromolecules* 39 (2006) 3056.
39. Ingall M. D. K., Honeyman C. H., Mercure J. V., Bianconi P. A., Kunz R. R., *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 3607.

40. Kim I.-J., Faust R., *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* 40 (2003) 991.
41. Rowe-Konopacki M. D., Boyes S. G., *Macromolecules* 40 (2007) 879.
42. Husseman M., Malmström E. E., McNamara M., Mate M., Mecerreyes D., Benoit D. G., Hedrick J. L., Mansky P., Huang E., Russell T. P., Hawker C. J., *Macromolecules* 32 (1999) 1424.
43. Wu T., Gong P., Szleifer I., Vlcek P., Subr V., Genzer J., *Macromolecules* 40 (2007) 8756.
44. Jonas A.M., Hu Z., Glinel K., Huck W. T. S., *Macromolecules* 41 (2008) 6859.
45. Chen J.-K., Hsieh C.-Y., Huang C.-F., Li P.-M., Kuo S.-W., Chang F.-C., *Macromolecules* 41 (2008) 8729.
46. Matyjaszewski K., Miller P. J., Shukla N., Immaraporn B., Gelman A., Luokala B. B., Siclován T. M., Kikelbick G., Vallant T., Hoffmann H., Pakula T., *Macromolecules* 32 (1999) 8716.
47. Becer C. R., Haensch C. C., Hoepfener S., Schubert U. S., *Small* 3 (2007) 220.
48. Dong R., Krishnan S., Baird B. A., Lindau M., Ober C. K., *Biomacromolecules* 8 (2007) 3082.
49. Crooks R.M., *Chemphyschem.* 2 (2001) 644.
50. Rowan B., Wheeler M. A., Crooks R. M., *Langmuir* 18 (2002) 9914.
51. Voit B., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 38 (2000) 2505.
52. Sheiko S. S., Gauthier M., Möller M., *Macromolecules* 30 (1997) 2343.
53. Callewaert M., Gohy J.-F., Dupont-Gillain C.C., Boulangé-Petermann L., Rouxhet P.G., *Surface Science* 575 (2005) 125.
54. Stenberg E., Persson B., Roos H., Urbaniczky C., *Journal of Colloid and Interface Science* 143 (1991) 513.
55. Biosensing Instruments: <http://www.biosensingusa.com/Application101.html>
56. Chapman R. G., Ostuni E., Takayama S., Holmlin R. E., Yan L., Whitesides G. M., *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 8303.
57. Chapman R. G., Ostuni E., Yan L., Whitesides G.M., *Langmuir* 16 (2000) 6927.
58. Chapman R.G., Ostuni E., Liang M.N., Meluleni G., Kim E., Yan L., Pier G., Warren H. S., Whitesides G. M., *Langmuir* 17 (2001) 1225.
59. Ostuni E., Chapman R.G., Holmlin R. E., Takayama S., Whitesides G. M., *Langmuir* 17 (2001) 5605.
60. Ostuni E., Grzybowski B. A., Mrksich M., C. S. Roberts, Whitesides G. M., *Langmuir* 19 (2003) 1861.
61. Barrett D. A., Hartshorne M. S., Hussain M. A., Shaw P. N., Davies M. C., *Anal. Chem.* 73 (2001) 5232.
62. Chang Y., Chen S., Zhang Z., Jiang S., *Langmuir* 22 (2006) 2222.
63. Zhang Z., Chen S., Jiang S., *Biomacromolecules* 7 (2006) 3311.
64. Alexa Fluor dyes: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
65. Ludden M. J. W., Ling X. Y., Gang T., Bula W. P., Gardeniers H. J. G. E., Reinhoudt D.N., Huskens J., *Chem. Eur. J.* 14 (2008) 136.
66. Wikipedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein\\_isothiocyanate](http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein_isothiocyanate)
67. Μαρκοπούλου Ο., “Εισαγωγή στα Βιοχημικά Συστήματα”, ΕΜΠ Αθήνα (1990).
68. McMurry J., “Οργανική Χημεία”, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2000).
69. [http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/A-index.cfm?definition=amino\\_acid](http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/A-index.cfm?definition=amino_acid)
70. Rusmini F., Zhiyuan Z., Feijen J., *Biomacromolecules* 8 (2007) 1775.
71. Sun X.-L., Stabler C.L., Cazalis C.S., Chaikof E.L., *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 52.
72. Duckworth, B. P., Xu, J., Taton, T. A., Guo, A.; Distefano, M. D., *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 967.
73. Goddard J.M., Hotchkiss J.M., *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 698.
74. Seigel R.R., Harder P., Dahint R., Grunze M., Josse F., Mrksich M., Whitesides G.M., *Anal. Chem.* 69 (1997) 3321.

75. Roach P., Eglin D., Rohde K., Perry C. C., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 18 (2007) 1263.
76. Popat K.C., Sharma S., Desai T.A., *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 5185.
77. Zhang M., Desai T., Ferrari M., *Biomaterials* 19 (1998) 953.
78. Bearinger J.P., Terrettaz S., Michel R., Tirelli N., Vogel H., Textor M., Hubbell J.A., *Nat Mater.* 2 (2003) 259.
79. Amiji M., Park K., *Biomaterials* 13 (1992) 682.
80. Neff J.A., Tresco P.A., Caldwell K.D., *Biomaterials* 20 (1999) 2377.
81. Liu V.A., Jastromb W.E., Bhatia S.N., *J. Biomed. Mater. Res.* 60 (2002) 126.
82. Pasche S., De Paul S.M., Vörös J., Spencer N.D., Textor M., *Langmuir* 19 (2003) 9216.
83. Blättler T. M., Pasche S., Textor M., Griesser H.J., *Langmuir* 22 (2006) 5760.
84. Andrade J. D., Hlady V., *Adv. Polym. Sci.* 79 (1986) 1.
85. Jeon S.I., Andrade J.D., *J. Colloid Interface Sci.* 142 (1991) 159.
86. Jeon S.I., Lee J.H., Andrade J.D., De Gennes P.G., *J. Colloid Interface Sci.* 142 (1991) 149.
87. McPherson T., Kidane, A., Szleifer, I., Park K., *Langmuir* 14 (1998) 176.
88. Pertsin A. J., Grunze M., *Langmuir* 16 (2000) 8829.
89. Pertsin A. J., Grunze M., Garbuzova I. A., *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 4918.
90. Harder P., Grunze M., Dahint R., Whitesides G. M., Laibinis P. E., *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 426.
91. Latour R. A., *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 78 (2006) 843.
92. Zheng J., Li L., Chen S., Jiang S., *Langmuir* 20 (2004) 8931.
93. Lopez G.P., Ratner B.D., Tidwell C.D., Haycox C.L., Rapoza R.J., Horbett T.A., *Journal of Biomedical Materials Research* 26 (1992) 415.
94. Luk Y.-Y., Kato M., Mrksich M., *Langmuir* 16 (2000) 9604.
95. Martwiset S., Koh A.E., Chen W., *Langmuir* 22 (2006) 8192.
96. Holland N. B., Qiu Y., Ruegsegger M., Marchant R. E., *Nature*, 392 (1998) 799.
97. Wyszogrodzka M., Haag R., *Biomacromolecules* 10 (2009) 1043.
98. Zhao C., Li L., Zheng J., *Langmuir* 26 (2010) 17375.
99. Kitano H., Tada S., Mori T., Takaha K., Gemmei-Ide M., Tanaka M., Fukuda M., Yokoyama Y., *Langmuir* 21 (2005) 11932.
100. Chevallier P., Janvier R., Mantovani D., Laroche G., *Macromol Biosci.* 5 (2005) 829.
101. Yao Y., Fukazawa K., Ma W., Ishihara K., Huang N., *Applied Surface Science* 258 (2012) 5418.
102. Hasegawa T., Iwasaki Y., Ishihara K., *J. Biomed. Mater. Res.* 63 (2002) 333.
103. Yang M.C., Lin W.C., *Polym Advan Technol.* 14 (2003) 103.
104. Alves N.M., Pashkuleva I., Reis R.L., Mano J.F., *Small* 6 (2010) 2208.
105. Bayliss S.C., Buckberry L.D., Fletcher I., Tobin M.J., *Sens. Actuators A*, 74 (1999) 139.
106. Thanawala S., Palyvoda O., Georgiev D.G., Khan S.P., Al-Homoudi I.A., Newaz G., Auner G., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 1745.
107. Zhu B., Zhang Q., Lu Q., Xu Y., Yin J., Hu J., Wang Z., *Biomaterials* 25 (2004) 4215.
108. Johansson F., Carlberg P., Danielsen N., Montelius L., Kanje M., *Biomaterials* 27 (2006) 1251.
109. Zhang J., Venkataramani S., Xu H., Song Y.-K., Song H.-K., Palmore G. T. R., Fallon J., Nurmikko A. V., *Biomaterials* 27 (2006) 5734.
110. Palyvoda O., Bordenyuk A. N., Yatawara A. K., McCullen E., Chen C.-C., Benderskii A. V., Auner G. W., *Langmuir* 24 (2008) 4097.
111. Cheng Z.Y., Teoh S.H., *Biomaterials* 25 (2004) 1991.
112. Podolnikova N. P., Yermolenko I. S., Fuhrmann A., Lishko V. K., Magonov S., Bowen B., Enderlein J., Podolnikov A. V., Ros R., Ugarova T. P., *Biochemistry* 49 (2010), 68.

113. Maheshwari G., Brown G., Lauffenburger D.A., Wells, L.G. Griffith A., *Journal of Cell Science* 113 (2000) 1677.
114. Tugulu S., Silacci P., Stergiopoulos N., Klok H.-A., *Biomaterials* 28 (2007) 2536.
115. Muguruma H., *Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 433.
116. Berrade L., Garcia A.E., Camarero J. A., *Pharm. Res.* 28 (2011) 1480.
117. Park T.H., Shuler M.L., *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 243.
118. Shin H., *Biomaterials* 28 (2007) 126.
119. Yap F.L., Zhang Y., *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 775.
120. Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G. M., Ingber D. E., *Biotechnol. Prog.* 14 (1998) 356.
121. Gu F., Wang J., Fu L., Ma Y.-J., *Chin. Med. J.* 124 (2011) 3394.
122. Hartsuch P., "Chemistry of Lithography", Lithographic Technical Foundation, New York (1961).
123. Παυλή Π., "Διερεύνηση της σχηματοποίησης και της χημικής πρόσδεσης βιομορίων με διεργασίες βασισμένες σε φωτοπολυμερικά υλικά", Μεταπτυχιακή Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα (2007).
124. Wallraff G. M., Hinsberg W. D., *Chem. Rev.* 99 (1999) 1801.
125. Γογγολίδης Ε., "Λιθογραφία και Εγχάραξη με Πλάσμα: Τα Εργαλεία για την Κατασκευή του Μικρο και Νανο-Κόσμου", Διδακτικές Σημειώσεις (διαφάνειες) βασισμένες στο βιβλίο: Plummer J.D., Deal M.D., Griffin P.B., "Silicon VLSI Technology", Prentice Hall Inc, New Jersey (2000).
126. Plummer J.D., Deal M.D., Griffin P.B., "Silicon VLSI Technology", Prentice Hall Inc, New Jersey (2000).
127. Xia Y., Rogers J.A., Paul K.E., Whitesides G.M., *Chem. Rev.* 99 (1999) 1823.
128. Αργεΐτης Π., "Πολυμερή στη Μικροηλεκτρονική", σημειώσεις μαθήματος στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών "Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της", ΕΚΠΑ (2002).
129. Yan M., Wybourne M.N., Keana J.F.W., *Reactive & Functional Polymers* 43 (2000) 221.
130. Fox R.B., Isaacs L.G., Stokes S., *Journal of Polymer Science: Part A 1* (1963) 1079.
131. Ταραντίλη Π.Α., Σημειώσεις μαθήματος "Πολυμερή: Παραγωγή και Μορφοποίηση Πολυμερικών Υλικών", ΕΜΠ (2005).
132. Reiser A., "Photoreactive Polymers: The Science and Technology of Resists", Wiley-Interscience, New York (1989).
133. Ito H., Maekawa Y., In "Polymeric Materials for Microelectronic Applications", ACS Symposium Series 529, Ito H., Tagawa S., Horie K., Eds., American Chemical Society, Washington, DC, (1994).
134. Hinsberg W., MacDonald S., Clecak N., Snyder C., Ito H., *Proc. SPIE*, 1925, 43 (1993).
135. Ito H., *J. Photopolym. Sci. Technol.* 11 (1998) 379.
136. Crivello J.V., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 37 (1999) 4241.
137. Crivello J. In "Radiation Curing in Polymer Science and Technology: Photoinitiating Systems", Fouassier J. P., Rabek J. F., Eds., Elsevier, New York, Vol. II, Chapter 8 (1993).
138. Crivello J.V., Bulut U., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 44 (2006) 6750.
139. Dektar J.L., Hacker N.P., *J. Photochem. Photob.* 46 (1989) 233.
140. Saeva F.D., *Advances in Electron Transfer Chemistry* 4 (1994) 1.
141. Saeva F.D. In "Topics in Current Chemistry", Springer-Verlag, New York, 159 (1990) 59.
142. Lowery T. H., Richardson K. S., In "Mechanism and Theory in Organic Chemistry", Chapter 7, 3<sup>rd</sup> ed., Harper and Row: New York, (1987).
143. McKean D., Schaedili U., MacDonald S., In "Polymers in Microlithography", ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, (1989).

144. Reichmanis E., Houlihan F., Nalamasu O., Neehan T., *Chem. Mater.* 3 (1991) 394.
145. Joshi M., Pinto R., Rao V. R., Mukherji S., *Applied Surface Science* 253 (2007) 3127.
146. Keller S., Blagoi G., Lillemose M., Haefliger D., Boisen A., *J. Micromech. Microeng.* 18 (2008) art. no. 125020.
147. Cavalli G., Banu S., Ranasinghe R. T., Broder G. R., Martins H. F. P., Neylon C., Morgan H., Bradley M., Roach P. L., *J. Comb. Chem.* 9 (2007) 462.
148. Argitis P., Boyatzis S., Raptis I., Glezos N., Hatzakis M., American Chemical Society, Symposium Series, Vol. 706, Chapter 26 (1998).
149. Carls J. C., Argitis P., Heller A., *J. Electrochem. Soc.* 139 (1992) 786.
150. Argitis P., Srinivas R.A., Carls J.C., Heller A., *J. Electrochem. Soc.* 139 (1992) 2889.
151. Αργεΐτη Π., “Πολυηλεκτρονική Φωτοαναγωγή των Ετεροπολυανιόντων  $P_2W_{18}O_{62}^{6-}$ ,  $PV_2W_{10}O_{40}^{5-}$ ,  $PV_2Mo_{10}O_{40}^{5-}$ ”, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών (1987).
152. Δημοτικάλη Δ., “Φωτοχημεία 1:12 Ετεροπολυβολφραμικών Αλάτων και 2:18 Φωσφορομολυβδαινικού Αμμωνίου”, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών (1984).
153. Douvas A.M., Makarona E., Glezos N., Argitis P., Mielczarski J.A., Mielczarski E., *ACS Nano* 2 (2008) 733.
154. Pope M.T., Müller A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) 34.
155. Douvas A. M., Kapella A., Dimotikali D., Argitis P., *Inorg. Chem.* 48 (2009) 4896.
156. Δημοτικάλη Δ.Α., “Βασικές Αρχές Φωτοχημείας”, ΕΜΠ Αθήνα (2005).
157. Βαλαβανίδης Αθ. Π., “Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων”, Σημειώσεις Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών (2006).
158. Νικολαΐδης Δ.Ν., “Οργανική Χημεία”, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη (1990).
159. Colpo P., Ruiz A., Ceriotti L., Rossi F., *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 117 (2010) 109.
160. Guo L.J., *Adv. Mater.* 19 (2007) 495.
161. Gates B.D., Xu Q., Stewart M., Ryan D., Willson G.C., Whitesides G.M., *Chem. Rev.* 105 (2005) 1171.
162. MacAlear J, Wehrung J., “Microsubstrates and Method for Making Micropattern Devices”, US Patent: 4,103,073, 1978.
163. MacAlear J.M., Wehrung J.M., “Microdevice Substrate and Method for Making Micropattern Devices”, US Patent: 4,103,064, 1978.
164. Wikipedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Lift-off\\_\(microtechnology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Lift-off_(microtechnology))
165. Hook A.L., Voelcker N.H., Thissen H., *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 2350.
166. Kleinfeld D., Kahler K. H., Hockberger P. E., *Neurosci.* 8 (1988) 4099.
167. Li N., Ho C.-M., *Journal of the Association for Laboratory Automation* 13 (2008) 237.
168. Kannan B., Castelino K., Chen F. F., Majumdar A., *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1960.
169. Falconnet D., Koenig A., Assi F., Textor M., *Adv. Funct. Mater.* 14 (2004) 749.
170. Hanein Y., Pan Y.V., Ratner B.D., Denton D.D., Böhringer K.F., *Sensors and Actuators B* 81 (2001) 49.
171. Pan Y.V., Hanein Y., Leach-Scampavia D., Böhringer K. F., Ratner B.D., Denton D.D., In *IEEE MEMS Technical Digest* 435 (2001).
172. Lu H., Homola J., Pan Y. V., Ratner B. D., Campbell C. T., Yee S. S., *Transactions of the Sixth World Biomaterials Congress, Society for Biomaterials* 151 (2000).
173. Mar M. N., Ratner B. D., Yee S. S., *Sensors Actuators B* 54 (1999) 125.
174. Δούβας Α., “Νέα Φωτοευαίσθητα Πολυμερικά Υλικά και Διεργασίες για Κατασκευή Βιομικροσυστημάτων”, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα (2003).
175. Χατζηρησιτίδη Μ., “Φωτοευαίσθητα Πολυμερικά Υλικά Μηχανισμού Χημικής Ενίσχυσης για Κατασκευή Μικροσυστημάτων”, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών (2004).
176. Chatzichristidi M., Petrou P. S., Douvas A. M., Diakoumakos C. D., Raptis I., Misiakos K., Kakabakos S. S., Argitis P., “Photolithographic Process Based on High

- Contrast Acrylate Photoresist for Multi-Protein Patterning” In “Biosurfaces and Biointerfaces”, edited by M. Firestone, J. Schmidt, N. Malmstadt (Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 950E, Warrendale, PA, 2007), 0950-D15-15.
177. Douvas A., Argitis P., Diakoumakos C.D., Misiakos K., Dimotikali D., Kakabakos S.E., *J. Vac. Sci. Technol. B* 19 (2001) 2820.
  178. Douvas A., Argitis P., Misiakos K., Dimotikali D., Petrou P., Kakabakos S., *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 269.
  179. Bhatia S.K., Teixeira J.L., Anderson M., Shriver-Lake L.C., Calvert J.M., Georger J.H., Hickman J.J., Dulcey C.S., Schoen P.E., Ligler F.S., *Analytical Biochemistry* 208 (1993) 197.
  180. Gallop M.A, Barrett R.W., Dower W.J., Fodor S.P.A., Gordon E.M., *Journal of Medicinal Chemistry* 37 (1994).
  181. Fodor S.P.A, Stryer L., Winkler J.L., Holmes C.P., Solas D.W., “Photolabile Nucleoside and Peptide Protecting Groups”, US Patent: 5,489,678, 1996.
  182. Koyano T., Saito M., Miyamoto Y., Kaifu K., Kato M., *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 141.
  183. He W., Halberstadt C.R., Gonsalves K. E., *Biomaterials* 25 (2004) 2055.
  184. Kim J.-B., Ganesan R., Yoo S. Y., Choi J.-H, Lee S. Y., *Macromol. Rapid Commun.* 27 (2006) 1442.
  185. Yang P., Zhang X., Yang B., Zhao X., Chen J., Yang W., *Advanced Functional Materials* 15 (2005) 1415.
  186. Nicolau D.V., Taguchi T., Taniguchi H., Yoshikawa S., *Langmuir* 14 (1998) 1927.
  187. Nicolau D.V., Taguchi T., Taniguchi H., Yoshikawa S., *Langmuir* 15 (1999) 3845.
  188. Nicolau D.V., Cross R., *Biosensors & Bioelectronics* 15 (2000) 85.
  189. Hoff J.D., Cheng L.J., Meyhöfer E., Guo L.J., Hunt A.J., *Nano Lett.* 4 (2004) 853.
  190. Amirpour M.L., Ghosh P., Lackowski W. M., Crooks R. M., Pishko M. V., *Anal. Chem.* 73 (2001) 1560.
  191. Pan Y.V., McDevitt T.C., Kim T.K, Leach-Scampavia D., Stayton P.S., Denton D.D., Ratner B.D., *Plasmas and Polymers* 7 (2002) 171.
  192. Yang I.H., Co C.C., Ho C.-C., *J. Biomed. Mater. Res.* 75A (2005) 976.
  193. Csucs G., Michel R., Lussi J.W., Textor M., Danuser G., *Biomaterials* 24 (2003) 1713.
  194. Feng C.L., Vancso G. J., Schönherr H., *Adv. Funct. Mater.* 16 (2006) 1306.
  195. Mendes P.M., Yeung C.L., Preece J.A., *Nanoscale Res. Lett.* 2 (2007) 373.
  196. Nam J.M., Han S.W., Lee K.-B., Liu X., Ratner M.A., Mirkin C.A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43 (2004) 1246.
  197. Lee K.B., Lim J.H., Mirkin C.A., *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5588.
  198. Lim J.-H., Ginger D.S., Lee K.-B., Heo J., Nam J.-M., Mirkin C.A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42 (2003) 2309.
  199. Hyun J., Lee W.-K., Nath N., Chilkoti A., Zauscher S., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 7330.
  200. Wadu-Mesthrige K., Xu S., Amro N.A., Liu G.-Y., *Langmuir* 15 (1999) 8580.
  201. Diakoumakos C.D., Raptis I., Tseripi A., Argitis P., *Polymer* 43 (2002) 1103.
  202. Diakoumakos C.D., Douvas A., Raptis I., Kakabakos S., Dimotikali D., Terzoudi G., Argitis P., *Microelectronic Engineering* 61-62 (2002) 819.
  203. Pierce site: <http://www.piercenet.com/>
  204. Νιάκουλα Δ., “Μελέτη θερμικών διεργασιών πολυμερικών υλικών εποξειδικής βάσης για εφαρμογές σε λιθογραφία ελεγχόμενης αντίθεσης”, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα (2002).
  205. Όξενκιουμ-Πετροπούλου Μ., “Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Οπτικές Μέθοδοι”, Αθήνα (1997).
  206. Όξενκιουμ-Πετροπούλου Μ., Συλλογική έκδοση Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Αθήνα (1999): Τσιβιλής Σ., Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους Ορατού.
  207. Thermo Nicolet, “Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, Thermo Nicolet Corporation (2001).

208. Wikipedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic\\_force\\_microscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_force_microscopy)
209. Amaral R., Chong L.H., "Surface Roughness" (2002)  
(<http://www.sjsu.edu/faculty/selvaduray/page/papers/mate210/surface.pdf>)
210. <http://www.sarc.manchester.ac.uk/group/vickerman.php>
211. Butler J.E., *Methods* 22 (2000) 4.
212. Eklab T., Liedberg B., *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15 (2010) 499.
213. Guo A., Zhu X.-Y., "The critical role of surface chemistry in protein microarrays", In "Functional Protein Microarrays in Drug Discovery", Ed. P.F. Predki, Chapter 6, CNR Press, (2006).
214. Blawas A.S., Reichert W.M., *Biomaterials* 19 (1998) 595.
215. Yamaguchi M., Nishimura O., Lim S.-H., Shimokawa K., Tamura T., Suzuki M., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 284–285 (2006) 532.
216. Mateo C., Torres R., Fernández-Lorente G., Ortiz C., Fuentes M., Hidalgo A., López-Gallego F., Abian O., Palomo J.M., Betancor L., Pessela B.C.C., Guisan J.M., Fernández-Lafuente R., *Biomacromolecules* 4 (2003) 772.
217. Kusnezow W., Jacob A., Walijew A., Diehl F., Hoheisel J.D., *Proteomics* 3 (2003) 254.
218. Bilitewski U., *Analytica Chimica Acta* 568 (2006) 232.
219. Marie R., Schmid S., Johansson A., Ejsing L., Nordströma M., Häfliger D., Christensen C.B.V., Boisen A., Dufva M., *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1327.
220. Tao S.L., Papat K.C., Norman J.J., Desai T.A., *Langmuir* 24 (2008) 2631.
221. Ratner B.D., Castner D.G., Horbett T.A., Lenk T.J., Lewis K.B., Rapoza R.J., *J. Vac. Sci. Technol. A* 8 (1990) 2306.
222. Sapsford K.E., Ligler F.S., *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004) 1045.
223. Glasgow K.C., Dhara D., In "Polymers for Biomedical Applications", American Chemical Society, Symposium Series, Chapter 16, (2008).
224. Wan W.K., Campbell G., Zhang Z. F., Hui A. J., Boughner D. R., *J. Biomed. Sci. Res.* 63 (2002) 854.
225. Mühlebach A., Müller B., Pharisa C., Hofmann M., Seiferling B., Guerry D., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 35 (1997) 3603.
226. Wu L., Brazel C.S., *International Journal of Pharmaceutics* 349 (2008) 144.
227. Shaheen S.M., Yamaura K., *Journal of Controlled Release* 81 (2002) 367.
228. Hickey A.S., Peppas N.A., *J. Membr. Sci.* 107 (1995) 229.
229. Katz M.G., Wydeven T., *J. Appl. Polym. Sci.* 27 (1982) 79.
230. Chen C.T., Chang Y.J., Chen M.C., Tobolsky A.V., *J. Appl Polym. Sci.* 17 (1973) 789.
231. Immelman E., Sanderson R.D., Jacobs E.P., van Reenan A.J., *J. Appl. Polym. Sci.* 50 (1993) 1013.
232. Zhao C., Li L., Zheng J., *Langmuir* 26 (2010) 17375.
233. Petrou P.S., Chatzichristidi M., Douvas A. M., Argitis P., Misiakos K., Kakabakos S. E., *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1994.
234. Jeyachandran Y.L., Mielczarski E., Rai B., Mielczarski J.A., *Langmuir* 25 (2009) 11614.
235. Cheng G., Zhanga Z., Chena S., Bryersb J.D., Jiang S., *Biomaterials* 28 (2007) 4192.
236. Wei J., Ravn D.B., Gram L., Kingshott P., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32 (2003) 275.
237. Ostuni E., Chapman R.G., Liang M.N., Meluleni G., Pier G., Ingber D.E., Whitesides G.M., *Langmuir* 17 (2001) 6336.
238. Chiu A.Y., Rao M. S., *Neurotherapeutics* 8 (2011) 744.
239. Khan S., Newaz G., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 93 (2010) 1209.
240. Turner J.N., Shain W., Szarowski D.H., Andersen M., Martins S., Isaacson M., Craighead H., *Experimental Neurology* 156 (1999) 33.
241. [http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/lab/cells/cell\\_PC12.htm](http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/lab/cells/cell_PC12.htm)

242. Papaconstantinou E., "Formation and properties of reduced: 18-Eteropoly molybdates and tungstates", Ph. D. Thesis, Georgetown University (1968).