Izrada podloga za stanično vođenje femtosekundnom laserskom ablacijom

Dora Radić-Lima

Fizički odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Bijenička cesta 32, Zagreb Mentor : doc. dr. sc. Vedran Đerek

21. siječnja 2025.

Aksonalni rast i vođenje ključni su za razvoj, regeneraciju i funkcionalnost živčanog sustava. Razumijevanje ovih procesa neophodno je za istraživanje dinamike živčanih puteva te karakterizaciju živih neuralnih mreža. Trenutno se razvija metoda za vrlo preciznu izradu staklenih podloga sa 3D geometrijskim uzorcima na skali veličine neurona, kojima se planira ispitati stanično vođenje. Kako bi se to postiglo, koristi se laserska ablacija kao precizan i svestran alat za modificiranje staklenih

površina na mikro- i nano-skali. Ova tehnika koristi ultrakratke laserske pulseve za izradu lokaliziranih topografskih naznaka uz minimalne toplinske učinke, osiguravajući da fizikalna, kemijska i strukturna svojstva materijala ostanu nepromijenjena.

1 Teorijski uvod

Razvoj i funkcionalnost živčanog sustava ovise o preciznoj komunikaciji između neurona, koja se uspostavlja formiranjem neuronskih mreža. Ova složena povezanost postiže se visoko koordiniranim procesima rasta neurona. Tijekom razvoja, neuroni produžuju dugačke aksone specijaliziranim strukturama koje prepoznaju i reagiraju na svoju okolinu. Te ekstenzije zovemo čunjićima rasta i odgovorni su za aktivno istraživanje vanjskih naznaka koje ih dovode do odgovarajućeg odredišta. Naznake mogu biti kemijske, topografske ili galvanotropskie pa se tako rast aksona može se usmjeriti modificiranjem podloge na mikro- i nano-razini. U ovom kontekstu potrebni su precizni alati za mikroobradu materijala, a jedan takav alat je laserska ablacija.

1.1 Laserska ablacija

Laserska ablacija termalni je ili netermalni proces uklanjanja površine krutog materijala ozračivanjem intenzivnom laserskom zrakom, bilo kontinuiranom ili pulsnom. Kao jedna od najvažnijih tehnika obrade materijala, laserska ablacija koristi se za bušenje, graviranje ili rezanje materijala, proizvodnju nanočestica ili pripremu površine materijala na mikrometarskoj skali [1]. Teorijski modeli uklanjanja materijala ozračivanjem površine laserom uvelike ovise o duljini pulsa jer ona određuje apsorpciju i disipaciju energije unutar materijala. Duži laserski pulsevi uzrokuju kontinuirano zagrijavanje ciljanog materijala. Energija pulsa tada se termalno širi izvan područja veličine laserske točke, uzrokujući stvaranje nekontroliranog sloja rastaljenog materijala što može rezultirati nepreciznom obradom površine. Nasuprot tome, tijekom interakcije ultra-kratkih, femtosekundnih pulseva s materijalom, provođenje topline je ograničeno. Zbog toga se materijal uklanja unutar prostorno dobro definirane zone, uz minimalna mehanička i toplinska oštećenja na ciljanom području [2]. Za potrebe ovog rada korišten je femtosekundni pulsni laser. Prikaz interakcija laserskih pulseva različitih duljina s materijalom možemo vidjeti na slici 1.



Slika 1: Usporedba interakcije dugog i kratkog laserskog pulsa s materijalom.

Interakcija femtosekundnog lasera i nemetalnih materijala je ultrabrzi nelinearan i neravnotežan proces u dva koraka. Prvi korak je ioniza-

cija koja obuhvaća fotoionizaciju i lavinsku ionizaciju [3]. Fotoionizacijom dobivamo početne (eng. seed) elektrone, tj. slobodne elektrone unutar materijala koji su nam potrebni za daljnju lavinsku ionizaciju. Nakon ionizacije, imamo dovoljno veliki broj slobodnih elektrona da nemetalni materijal počne pokazivati metalna svojstva. Drugi korak uključuje dva suprotstavljena mehanizma koja dovode do uklanjanja materijala i ablacije. U termalnoj fazi, porast temperature iznad vrelišta rezultira taljenjem i dolazi do termalnog isparavanja materijala. U netermalnoj fazi, glavni proces je Coulombova eksplozija u kojoj pobuđeni elektroni izbačeni s površine nakon apsorpcije laserskog pulsa stvaraju električno polje zbog razdvajanja naboja između izbačenih elektrona i visoko ioniziranih atoma. Nastalo električno polje povlači ione van materijala što rezultira uklanjanjem prvih nekoliko slojeva materijala [4].

1.2 Supstrat

U ovom radu lasersku ablaciju radit ćemo na okruglom borosilikatnom staklu promjera 30mm, debljine 400nm koje na jednoj strani ima sloj ITOa debeo 200nm. Staklo se koristi kao podloga zbog svoje jedinstvene kombinacije optičke prozirnosti, inertnosti i termomehaničkih svojstava, što ga čini izuzetno pogodnim za biološke primjene, kao i za primjene u mikro- i nanotehnologiji. Njegova prozirnost posebno je važna za medicinska i biološka istraživanja koja se oslanjaju na mikroskopske tehnike, jer omogućuje korištenje inverznih mikroskopa koji osvjetljavaju uzorke odozdo, omogućujući visokorezolucijsko snimanje bioloških procesa bez smetnji. Nadalje, mikrostrukture na bazi stakla široko se primjenjuju u biomedicini, biokemiji, uređajima "lab-on-chip", senzorima i MEMS tehnologijama. U gotovo svim slučajevima potrebno je izbjeći oštećenja i mikropukotine oko područja obrađenog laserom, a femtosekundni laseri su se pokazali kao izvrsni alat za tako preciznu obradu [5]. Ova mogućnost preciznog mikrostrukturiranja površine stakla ključna je za stvaranje biomimetičkih površina koje mogu usmjeravati rast aksona, što staklo čini idealnim materijalom za buduća istraživanja vođenja aksona i razvoja živčanog sustava.

2 Eksperimentalni postav i metode mjerenja

Za obradu uzoraka koristimo Light Conversion Pharos PH2 femtosekundni laser maksimalne snage 15W. Unutar njega, kao laserski medij koristi se kristal kalij gadolinij volframata $(KGd(WO_4)_2KGW)$ dopiran ionima iterbija Yb^{3+} . Valna duljina prijelaza između pobudenog i osnovnog stanja je 1030nm. PHAROS laser ima maksimalnu energiju pulsa od 1.5mJ, podesivo trajanje pulsa između 190 fs i 10 ps i maksimalnu izlaznu frekvenciju 1 MHz [6]. Unutar modula se također nalaze atenuatori s kojima kontroliramo energiju pulsa. Koristili smo trajanje pulsa 200 fs i izlazne frekvencije 10 kHz, 20 kHz, 100 kHz i 200 kHz. Laserska zrake usmjerava se i fokusira zrcalima i zatvaračima. Uzorak se postavlja na pomično Newport XY linearno translacijsko postolje i fiksira. Rad postolja i lasera kontrolira računalni program Newportov Laser Machining Software koji omogućuje otvaranje CAD datoteka s dizajniranim uzorcima te istovremenu kontrolu postolja i lasera čime olakšava sinkronizaciju uredaja. Pharos femtosekundni laser prikazan je na slici 2.



Slika 2: Lijevo: Light Conversion Pharos PH2 femtosekundni laser, preuzeto s izvora [6]. Desno: fokusiranje laserske zrake optičkim komponentama od kojih je zadnja objektiv s povećanjem 5 puta i pomično postolje.

Nadalje, uređaji korišteni za karakterizaciju proizvedenih podloga su redom: ultrazvučna kada, termalni evaporator, optički profilometar i skenirajući elektronski mikroskop.

2.1 Priprema uzorka

Kako bismo započeli s procesom karakterizacije proizvedenih podloga nakon laserske ablacije, potrebno je na površinu nanijeti tanki reflektirajući sloj. Ovaj korak nužan je za smanjenje prozirnosti stakla, čime se poboljšava kontrast tijekom snimanja i omogućava dobivanje visokokvalitetnih površinskih profila korištenjem tehnika optičke profilometrije i skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Prije evaporacije, staklo kemijski čistimo.

Postupak kemijskog čišcenja odvija se u 4 koraka, od kojih svaki traje 15 minuta i podrazumijeva uranjanje posude s različitim tekućinama i potopljenim uzorkom u ultrazvučnu kadu prikazanu na slici 3. Za tekućine koristimo redom: izopropilni alkohol, aceton, 2% vodenu otopinu deterdženta Hellmanex, te deioniziranu vodu.



Slika 3: Čišćenje uzoraka u ultrazvučnoj kadi.

Nakon čišćenja, na čiste uzorke termalnom vakuumskom evaporacijom nanosimo tanke slojeve aluminija debljine oko 10nm. Materijal od kojega se želi dobiti tanak film termalnom se evaporacijom u vakuumu isparuje iz čvrste faze te se taloži na supstrat koji je postavljen na vrh komore, nasuprot izvoru. Zbog visokog vakuuma, budući je broj sudara s molekulama zraka značajno smanjen, srednji slobodni put para materijala veći je od dimenzija vakuumske komore. Kao rezultat, ispareni materijal putuje nesmetano, pravocrtno prema supstratu omogućući ravnomjerno nanošenje tankog filma na njegovu površinu. Shema postava za termalnu vakuumsku evaporaciju prikazana je na slici 4. Uzorci su tada spremni za snimanje i mjerenje karakteristika optičim profilometrom i skenirajućim elektronskim mikroskopom.



Slika 4: Lijevo: Shema komore za termalnu evaporaciju. Preuzeto s izvora [7] i prilagođeno. Desno: korišteni termalni vakuumski evaporator.

Na samom kraju, stakleni uzorci podvrgnuti su jetkanju u otopini kako bi se poboljšalja svojstva njihove površine. Jetkanje je provedeno u vodenoj otopini kalijeva hidroksida (KOH) pri temperaturi od 85°C, u trajanju do 1 sata [11]. Prilikom jetkanja stakla otopinom KOH, hrapave površine jetkaju se brže od glatkih jer imaju veću površinu, što omogućuje više aktivnih mjesta za kemijsku reakciju s KOH-om i uklanjanje materijala. Nepravilnosti grubih površina također poboljšavaju difuziju otopine za jetkanje u udubine, održavajući veće brzine jetkanja. Brže jetkanje grubih staklenih površina svojstvo je koje se može iskoristiti za kontrolirano zaglađivanje i obradu stakla. Nakon procesa jetkanja, ponovno su mjerene karakteristike staklenih uzoraka.

2.2 Snimanje uzoraka

Optički profilometar je uredaj koji bez kontakta s površinom uzorka precizno mjeri površinski profil uzorka s visokom preciznošću. Koristimo Filmetrics Profilm 3D profilometar s objektivima Nikon 10x i 50x DI. Radi tako da emitira svjetlost, obično iz lasera ili bijelog izvora svjetlosti, na površinu materijala. Dio upadne svjetlosti putuje do uzorka, a dio do referentnog zrcala. Nakon refleksije zrake se rekombiniraju u polupropusnom zrcalu i dobivamo interferencijsku sliku. Interferencijski uzorak se snima elektroničkim senzorom te se procesira putem računalnog programa. Za analizu podataka dobivenih s profilometra koristimo aplikaciju Profilm Online. Slika optičkog profilometra korištenog u radu prikazana je na slici 5.



Slika 5: Lijevo: Shema optičkog profilometra, preuzeto s izvora [9] i prilagođeno. Desno: Filmetrics Profilm 3D profilometar.

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) koristi fokusirani snop elektrona za skeniranje površine uzorka. Elektroni izlaze iz elektronskog topa i ubrzavaju se prolazeći kroz uredaj na koji je postavljen naponu akceleracije. Ubrzani elektroni nose veliku količinu kinetičke energije koja se troši na različite načine dok se elektroni usporavaju u uzorku. Ova interakcija rezultira različitim signalima, poput sekundarnih elektrona, povratno raspršenih elektrona , x-zrake i vidljiva svjetlost koji se detektiraju kako bi se stvorila slika i pružila informacija o topologiji uzorka. Slika skenirajućeg elektronskog mikroskopa korištenog u radu prikazana je na slici 6 desno.



Slika 6: Lijevo: Shema skenirajućeg elektronskog mikroskopa, preuzeto s izvora [10] i prilagođeno. Deasno: Tescan Vega3 SEM, preuzeto s izvora [8].

3 Obrada rezultata i diskusija

Na staklenim supstratima napravljene su linije duljine 1mm s različitim parametrima lasera. Mijenjali smo postavke atenuatora, broj prolaska i brzinu pokretnog postolja. Reprezentativni uzorak snimljene mikroskopom može se vidjeti na slici 7. Iako su linije naizgled slične pod mikroskopom, napravljene su korištenjem značajno različitih laserskih parametara. Te varijacije u parametrima odrazit će se na njihovoj širini, dubini i hrapavosti, što će biti analizirano u daljnjim profilometrijskim i SEM mjerenjima.



Slika 7: Proizvedeni uzorak na borosilikatnom staklu.

Slike sa SEM-a iste linije prije i poslije jetkanja u otopini KOH prikazane su na slici 8. Na SEM slikama primjećujemo da nakon jetkanja u KOH, linije na površini stakla postaju šire i glađe. Ovaj učinak rezultat je prirode procesa jetkanja, koji selektivno otapa hrapave površine brže od glatkih. Ova selektivna obrada poboljšava ukupnu kvalitetu površine, čineći je ravnomjernijom i smanjujući oštre rubove ili nepravilnosti koje su bile prisutne na početku. Takve nesavršenosti želimo izbjeći jer mogu zarobiti mjehuriće zraka ili uzrokovati neravnomjerno nanošenje tekućine koje sadrže neurone i utjecati na pouzdanost eksperimentalnih uvjeta u daljnim istraživanjima.



Slika 8: SEM slike linije prije (lijevo) i poslije (desno) jetkanja u otopini KOH. Linija je napravljena sa brzinom pokretnog postolja 1mm/s, 6% postavkom atenuatora, izlazne frekvencije 200kHZ i 0.2 filterom.

3.1 Analiza uzorka

Iznose širine i dubine linija očitavamo u Profilm Online aplikaciji. Prikaz podataka dobivenih profilometrom možemo vidjeti na slici 9. U okolici linije na svim promatranim postavkama ablacije, prisutan je sloj ablatiranog materijala čija debljina raste s isporučenom energijom.



Slika 9: Prikaz podataka dobivenih profilometrom za uzorak s postavkama atenuatora A = 100%, izlazne frekvencije 10kHz i brzinom pokretnog postolja 1mm/s. a) 3D prikaz. b) Graf ovisnosti dubine presjeka linije o udaljenosti. c) 2D prikaz.

3.2 Rezultati mjerenja

Ovisnost širine i dubine linije o postavkama atenuatora možemo vidijeti na slici 10. Širina i dubina linija povećavaju se s rastom postotka atenuatora. To je zato što se podešavanje atenuatora na veći postotak (tj. smanjenjem atenuacije) povećava energija isporučena materijalu i dovodi do većeg uklanjanja materijala. Međutim, ovaj trend neće trajati beskonačno, jer izuzetno visoke razine energije mogu dovesti do zasićenja, poput prekomjernog taljenja ili redepozicije materijala oko udubine, što spriječava daljnje produbljivanje. S povećanjem atenuatora za proizvodnju linija stali smo kad smo vidjeli značajne negativne efekte na materijal (pukotine).



Slika 10: Ovisnost širine i dubine linije o postavci atenuacije lasera na borosilikatnom staklu, izazne frekvencije 10kHz i brzinom pokretnog postolja 1 mm/s.

Ovisnost širine i dubine o broju prolaska možemo vidjeti na slici 11. Povećanjem broja prolaska, linije postaju šire i dublje. To je zato što svaki prolaz lasera dovodi više energije materijalu, postupno uklanjajući više materijala sa svakim sljedećim zračenjem. Velike pogreške u mjerenjima mogu se pripisati velikoj hrapavosti površine uzoraka, što predstavlja izazov za precizna mjerenja profilometrom. Hrapave površine neregularno raspršuju svjetlo, što komplicira interpretaciju interferencijskih uzoraka u optičkoj profilometriji i dovodi do veće nesigurnosti u mjerenju.



Slika 11: Ovisnost širine i dubine linije o broju prolaska, s brzinom pokretnom postolja 1mm/s, postavkama atenuatora A = 8%, izlazne frekvencije 200kHz i filterom 0.2

Ovisnost širine i dubine linije o brzini pokretnog postolja prije i poslije jetkanja u otopini KOH možemo vidjeti na slici 12. Prije jetkanja u KOHu, ovisnost dubine kanala o brzini nije odmah uočljiva, zbog nakupljanja abliranog materijala unutar kanala, što zaklanja stvarni profil dubine. Međutim, nakon jetkanja u KOH-u, koje učinkovito otapa i uklanja taj zaostali materijal, temeljna veza postaje jasna. Dubina abliranih kanala pokazuje snažnu ovisnost o brzini pokretnog postolja, pri čemu sporije brzine rezultiraju dubljim kanalima. Naime, pri manjim brzinama, laserska zraka duže djeluje na isto područje, što omogućuje da se više energije deponira u materijal, rezultirajući dubljom penetracijom i širim područjem uklanjanjem materijala. Nasuprot tome, pri većim brzinama, smanjuje se kumulativnu energiju u zoni ablacije i proces uklanjanja materijala slabi. Nakon jetkanja staklene površine u KOH otopini, primjećuje se da kanali postaju ne samo dublji već i širi. Tijekom procesa, jetkanje ide ravnomjerno u svim smjerovima pa se zidovi kanala jetkaju zajedno s dnom što uzrokuje istovremeno produbljivanje i širenje kanala. Osim toga, KOH brže rubova i hrapavih dijelova, što rezultira glađim i strmijim zidovima kanala.



Slika 12: Ovisnost širine i dubine linije o brzini pokretnog postolja, s postavkama atenuatora A = 8%, izlazne frekvencije 200kHz i filterom 0.2

4 Zaključak

U ovom radu koristili smo lasersku ablaciju kao vrlo preciznu tehniku za modificiranje površina materijala na mikro i nano razinama. Koristeći femtosekundni laserski postav, proizveli smo linije na borosilikatnom staklu i analizirali ih metodama profilometrije i skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Uspješno smo okarakterizirali lasersko mikrostrukturiranje staklenih podloga koje bi se mogle koristiti za istraživanje staničnog vođenja.

Izmierili smo da se širina i dubina linije povećavaju s rastom broja prolaska i postotka atenuatora te smanjuje s povećanjem brzine pokretnog postolja. Dodatno, kako bismo poboljšali kvalitetu tih mikrostruktura, uzorke smo jetkali u otopini KOH, koje je uklonilo ostatke materijala preostalog nakon procesa laserske ablacije. Ovaj postupak jetkanja nije samo produbio kanale, već ih je i proširio, zbog ujednačenog jetkanja u svim smjerovima. KOH tretman također je pomogao u zaglađivanju oštrih rubova i nepravilnosti, rezulti-

otapa područja s većom površinskom, poput oštrih rajući dobro definiranim zidovima kanala pogodnim za biološke primjene.

> U budućim primjenama, mikrostrukturirane podloge za rast aksona trebat će održati svoju optičku prozirnost. Ova prozirnost je ključna za biološka istraživanja, osobito kada se stanično vođenje promatra kroz inverzni mikroskop. Zaglađivanje ovih mikrostruktura, poput kanala, osiguralo bi detaljno promatranje rasta i ponašanja neurona.

> Kroz ovaj rad ostvareni su prvi koraci u razvoju podloga za topografsko stanično vođenje. Tehnika laserske mikroobrade nudi mogučnost lake i brze prilagodbe dizajna i proizvodnje strukturiranih staklenih supstrata. U budućim istraživanjima potrebno je provesti testiranja rasta neurona in vitro na takvim podlogama kako bi se procijenila njihova učinkovitost u staničnom vođenju.

Literatura

- [1] Zhang, Duanming & Guan, L. (2014). Laser Ablation. Comprehensive Materials Processing. 4. 125-169.
- [2] Hamad, A. H. High Energy and Short Pulse Lasers: Effects of Different Laser Pulse Regimes (Nanosecond, Picosecond and Femtosecond) on the Ablation of Materials for Production of Nanoparticles in Liquid Solution. InTech, (2016).
- [3] Guo, B. et al. Femtosecond laser micro/nanomanufacturing: theories, measurements, methods, and applications. Nanomanufacturing and Metrology. Vol. 3, (2020).
- [4] Harilal, S. S. et al. Optical spectroscopy of laser-produced plasmas for standoff isotopic analysis. Applied Physics Reviews. Vol. 5, 2(2018).
- [5] Rihakova, L.; Chmelickova, H. Laser Micromachining of Glass, Silicon, and Ceramics. Advances in Materials Science and Engineering. Vol. 2015, 1(2015)
- [6] PHAROS Modular-Design Femtosecond Lasers for Industry and Science, Light Converhttps://lightcon.com/product/pharossion. femtosecond-lasers/
- [7] Aus Najim, Malek Muhi, Kadhim Gbashi, Ammar T. Salih: Synthesis of Efficient and Effective -MnO2/-Bi2O3/a-Si Solar Cell by Vacuum

Thermal Evaporation Technique. Springer Nature (2018.)

- [8] VEGA3 3rd Generation of VEGA SEMs, Tescan Korea, http://www.tescan.co.kr/product/em/em01
- Bakhtazad, A. and Chowdhury, S., 2019. An evaluation of optical profilometry techniques for CMUT characterization. Microsystem Technologies, 25(9)
- [10] Mukhopadhyay, A., Measurement of magnetic hysteresis loops in continuous and patterned ferromagnetic nanostructures by static magnetooptical kerr effect magnetometer, Department of PhysicsIndian Institute of Technology,Guwahati
- [11] Butkute, A., Merkininkaite, G., Jurkšas, T., Stancikas, J., Baravykas, T., Vargalis, R., Tickunas, T., Bachmann, J., Šakirzanovas, S., Sirutkaitis, V., et al. Femtosecond Laser Assisted 3D Etching Using Inorganic-Organic Etchant. Materials (2022.)
- [12] Butkute, A., Jurkšas, T., Baravykas, T., Leber, B., Merkininkaite, G., Žilenaite, R., Cereška, D., Gulla, A., Kvietkauskas, M., Marcinkeviciute, K., et al. Combined Femtosecond Laser Glass Microprocessing for Liver-on-Chip Device Fabrication. Materials (2023.)
- [13] Adela Ben-Yakar et al. Thermal and fluid processes of a thin melt zone during femtosecond laser ablation of glass: the formation of rims by single laser pulses, 2007 J. Phys. D: Appl. Phys. 40