

PROIECTAREA ȘI ELABORAREA MATRICEI DE ELECTROZI PENTRU MĂSURAREA BIOIMPEDANȚEI CELULARE

Alexandrina ȚURCANU^{1*}

¹Universitatea Tehnică a Moldovei, Facultatea Calculatoare, Informatică și Microelectronică (FCIM),
Departamentul Microelectronică și Inginerie Biomedicală (DMIB), Centrul Național de Studiu și Testare a
Materialelor (CNSTM), grupa IBM-171, Chișinău, Republica Moldova

*Autorul corespondent: Alexandrina Țurcanu, e-mail alexandrina.turcanu@mib.utm.md

Rezumat. În lucrarea dată am elaborat o matrice de electrozi la cost redus pentru determinarea adeziunii, gradului de proliferare și confluență a celulelor vii în regim dinamic. Analizând lucrările științifice din domeniu, a fost selectat modelul matematic optim pentru a fi implementat la analiza în timp real a modificărilor impedanței electrice a sistemului, ceea ce reflectă procesul de proliferare a celulelor vii. A fost elaborat design-ul electrozilor, sistemul de achiziție a datelor. Utilizând infrastructura și tehnologia existentă la Centrul Național de Studiu și Testare a Materialelor din cadrul UTM, a fost realizat primul prototip.

Cuvinte-cheie: ECIS, matrice de electrozi, circuit echivalent, sistem de achiziție de date.

Introducere

Studierea morfologiei și parametrilor celulari poate fi efectuată *in vitro* pentru depistarea cancerului, activității imune a celulelor, în farmacocinetică și detectarea toxinelor. Pe lângă metodele tradiționale de caracterizare cu ajutorul microscopiei optice, metoda spectroscopiei de impedanță electrică permite monitorizarea parametrilor celulari în timp real și la distanță.

Modificarea impedanței celulare în dependență de adeziunea celulelor pe substrat, prin aplicarea unui semnal alternativ, înlocuiește metodele de vizualizare a comportamentului celular cu ajutorul metodelor optice clasice. Astfel, determinarea parametrilor dinamici ai unei culturi de celule – adeziunea, proliferarea, confluența poate fi realizată prin spectroscopia de impedanță electrică celulă-substrat, denumită ECIS [1].

Studiile ulterioare au introdus în sistemul de măsurare a impedanței celulare un așa-numit bio-oscilator, caracterizat de următorii parametri: frecvența, amplitudinea și defazajul semnalului aplicat, care sunt proporționali parametrilor dinamici ai culturilor celulare. Avantajul sistemelor oscilante constă în evitarea utilizării unor circuite adiționale de excitație [2].

În procesul proiectării matricei de electrozi, parametri precum capacitatea stratului dublu, rezistența între celulă și electrod, impedanța Warburg influențează măsurările, astfel reprezentarea schemelor electrice echivalente și modelărilor matematice corespunzătoare asigură acuratețea și precizia rezultatelor [3]. Modelările matematice indică distribuția curentului electric prin electrozi, cu scopul elaborării cât mai eficiente a electrozilor – alegerea diametrului electrodului activ și electrodului neutru, suprafeței totale a senzorului, cât și a distanței între electrozi [4]. Pe lângă acestea, frecvența de lucru a sistemului se ia în considerare, influențând impedanța măsurată [5]. De asemenea, spectrul de impedanță este specific fiecărei culturi de celule.

Modelul matematic al impedanței celulare

Rezultatele experimentale raportate în literatura de specialitate indică dependența impedanței măsurate față de raza electrodului activ, precum și de suprafața totală de măsurare a senzorului în modul următor: dimensiunile mai mici ale electrodului activ produc valori mai înalte ale impedanței, îmbunătățind totodată raportul semnal-zgomot [4].

Impedanța unui monostrat de celule (Z) este calculată ca suma dintre impedanța electrodului activ Z_{activ} , impedanța electrodului neutru Z_{neutru} și impedanța electrolitului R_s , reprezentată în Ec. (1).

$$Z = Z_{activ} + Z_{neutru} + R_s = \left(\frac{1}{S_1} + \frac{1}{S_2} \right) \left[Z_n + \frac{S(Z_{celulă} + Z_{celulă - sub})}{n} \right] + R_s \quad (1)$$

unde Z_n este impedanța electrod-mediu (Ωm^2); S_1 și S_2 reprezintă aria electrodului activ și electrodului neutru, respectiv; S este suprafața totală a senzorului; n este numărul celulelor atașate pe senzor; R_s este impedanța mediului de cultură; $Z_{celulă-sub}$ reprezintă impedanța mediului de cultură între interfața electrod-electrolit și partea ventrală a celulei [4].

Atunci când impedanța este analizată sub formă de parametri ce o compun – rezistența și capacitatea, pot fi obținute informații valoroase despre comportamentul celulelor [6]. Modelul electrod-electrolit a fost studiat pe larg în literatură. [3, 4, 7] La interfața electrod-electrolit apar următoarele componente, reprezentate în Fig. 1: (1) C_1 , capacitatea stratului dublu electric; (2) R_1 , rezistența de transfer, ce modelează parcurgerea curentului de la electrod spre electrolit; (3) Z_w , impedanța Warburg, datorită difuziei dinspre electrod către electrolit, reprezentată în Fig. 1 ca

$C_1 \parallel R_1$; (4) R_s , rezistența ce influențează parcurgerea curentului prin electrolit. În cele din urmă, (5) R_{gap} reprezintă rezistența dintre celulă și electrod, ce depinde de distanța celulă-electrod și de gradul de atașare, umplere a celulelor pe suprafața electrodului [3].

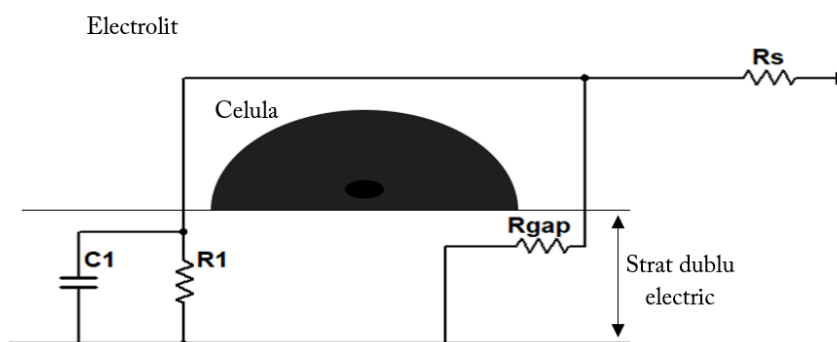


Figura 1. Schema echivalentă electrod-electrolit

Proiectarea matricei de electrozi

Celulele ce aderă de substrat formează o interfață electrod-electrolit. Pe măsura atașării și răspândirii pe suprafața electrozilor, celulele împiedică fluxul de curent ionic, modificând interfața electrod-electrolit, iar impedanța de ieșire indică proliferarea și, respectiv, gradul de confluență al celulelor.

Pentru proiectarea electrozilor coplanari, o provocare rămâne selectarea corectă a dimensiunilor acestora, astfel încât impedanța măsurată să ofere informații utile despre schimbările morfologice ale celulelor aderente. Studiile anterioare [4, 5] demonstrează alegerea diametrului optim al electrodului activ fiind de 250 μm . La fel, microelectrozii cu dimensiunile mai mici decât 250 μm , dimensiuni ce sunt comparabile cu dimensiunile celulare, sunt elaborați pentru monitorizarea comportamentului unei singure celule. Electrodul neutru de regulă are o suprafață mare cu scopul obținerii unei densități mici a curentului.

Frecvența de lucru a sistemului influențează rezultatele măsurărilor prin efectele pe care le produce asupra liniilor de curent electric la interfața celulă-electrod: la frecvențe mai mici de 2 kHz curentul va curge prin soluție în partea ventrală a celulelor adiacente și între acestea. Pe de altă parte, la frecvențe mai mari de 40 kHz, curentul va curge prin membranele celulare izolatoare și va induce o capacitate. Impedanța obținută la frecvențe mari va fi afectată de gradul de atașare a celulelor, în timp ce impedanța obținută la frecvențe mici va fi influențată de schimbările în spațiile de sub celule și între acestea [6]. Valorile optime ale frecvenței au fost determinate experimental pentru diferite culturi de celule, variind de la 500 Hz la 4 kHz [5].

Astfel, conform studiului efectuat, în lucrarea dată am optimizat și proiectat un senzor cu diametrul electrodului activ de 250 μm . Spre deosebire de senzorii ECIS comerciali, [6] am ales

o dimensiune redusă a suprafeței totale de măsurare, cu scopul fabricării unui senzor portabil, wireless, la fel, cu posibilitatea integrării acestuia pe un suport flexibil, pentru măsurări ulterioare in vivo utilizând electrozi din matrice 3D elaborate în baza materialelor semiconductoare, obținute la CNSTM (Aero-GaN, aero-Ga₂O₃, etc.).

Metode tehnologice de fabricare a electrozilor și materialele utilizate

Fotolitografia. Am elaborat matricea de electrozi proiectată pe un substrat de sticlă prin fotolitografie. Fotorezistul negativ ma-N 415 a fost depus pe substrat prin spin-coating la 4000 rot/min, timp de 40 s, ulterior fiind supus unui tratament termic, la 95°C, pentru 120 s (Fig. 2a). Metoda fotolitografiei constă în expunerea substratului, împreună cu fotorezistul depus la lumină ultravioletă (UV), în așa mod, regiunile de fotorezist neacoperite de mască vor fi expuse la lumina UV ce va duce la ruperea legăturilor chimice. Prin dezvoltarea ulterioară cu developantul ma-D 331, produs de Microresist Technologies, regiunile neexpuse au fost înlăturate. Ulterior, am efectuat tratament în plasmă de oxigen la 20 W, fluxul de 5 sccm, pentru 60 s, la instalația Aurion, cu scopul curățirii suprafeței senzorului în urma procesului de fotolitografie și pregătirii acestuia pentru depunerea unui strat metalic prin evaporare termică în vid, ce va asigura o adeziune mai bună a metalului depus la substratul de sticlă. Prin evaporare termică în vid a fost depus un strat de Cu cu grosimea de aproximativ 400 nm, urmând depunerea unui strat de Au de 50 nm la instalația Cressington, Sputter Coater pe toată suprafața substratului. Procesul de lift-off a fost efectuat în acetonă, astfel, regiunea acoperită de fotorezist a fost înlăturată și am obținut matricea de electrozi din Cu/Au. Senzorul a fost supus unui tratament termic la 150 °C, timp de 1 h, pentru a mări adeziunea metalelor de substrat. Stratul de Au depus împiedică oxidarea Cu la temperaturi înalte și asigură conductivitatea electrozilor.

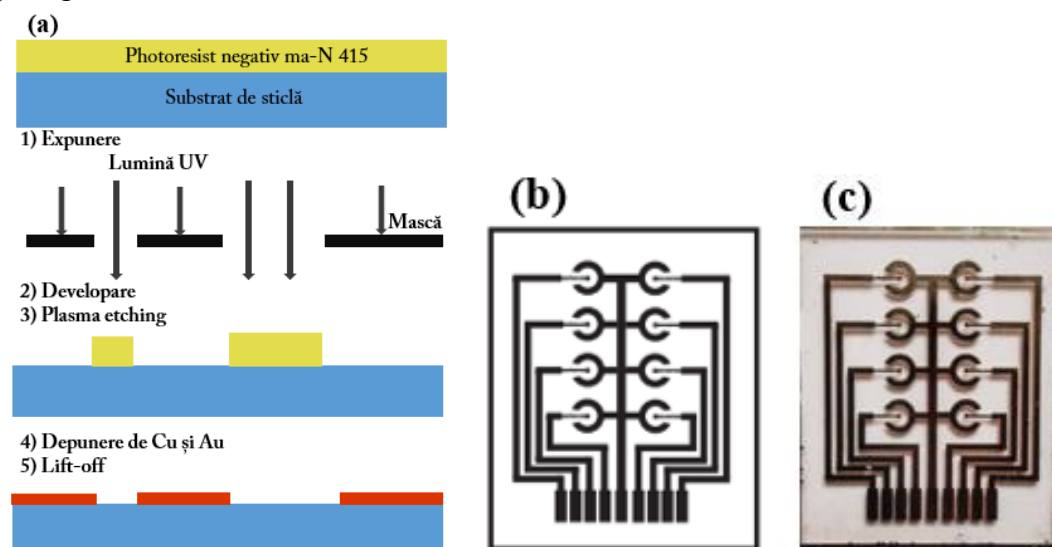


Figura 2. (a) Reprezentarea schematică a procesului de fotolitografie și depunere a metalelor. (b) Design-ul matricei de electrozi. (c) Imaginea fotografică a senzorului obținut.

Sistemul de achiziție al datelor

Pornind de la principiul spectroscopiei de impedanță electrică, sistemului i se aplică un semnal sinusoidal de la generator. Însă, au fost efectuate circuite care exclud necesitatea utilizării unui generator extern, transformând circuitul de bio-impedanță într-un oscilator de tensiune, parametrii căruia – frecvența și amplitudinea sunt proporționali parametrilor dinamici ai celulelor [2, 3]. Oscilatorul este obținut prin conectarea amplificatoarelor operaționale, rezistențelor și capacităților [3].

Studiile anterioare au arătat eficacitatea elaborării unui circuit de cost redus, compact, portabil, prin amplasarea acestuia în interiorul unui incubator, pentru asigurarea condițiilor de mediu potrivite culturilor celulare în timpul măsurărilor impedanței [8].

Selectarea semnalelor de la fiecare electrod are loc prin utilizarea multiplexoarelor cu 8 sau 16 canale, în dependență de numărul electrozilor [3, 7]. Pentru a fi citite și interpretate de microcontroler. Semnalele obținute sunt amplificate cu ajutorul amplificatoarelor de instrumentație sau amplificatoarelor operaționale. Cele din urmă au un cost mai redus, fiind utilizate deseori pentru sistemul de achiziție al datelor [8].

Sistemul de achiziție al datelor pentru lucrarea dată urmează a fi îmbunătățit prin implementarea algoritmului pentru măsurarea impedanței de microcontroller.

Concluzii

Lucrarea dată descrie metoda spectroscopiei de impedanță electrică pentru determinarea parametrilor culturilor celulare, ECIS. A fost elaborat un prototip al unui senzor la cost redus destinat măsurării parametrilor celulari dinamici pentru perioade extinse. Dezvoltarea ulterioară a acestuia va permite monitorizarea în dinamică a proceselor de proliferare celulară pe suprafața implantelor 3D, ceea ce nu poate fi realizat prin metode clasice de microscopie optică.

Mulțumiri

Autorul aduce mulțumiri conducătorului Centrului Național de Studiu și Testare a Materialelor, acad. Ion TIGHINEANU, coordonatorului tezei de licență, dr., conf. Eduard MONAICO, precum și colegilor, dr. Tudor BRANIȘTE și Vladimir CIOBANU. Această lucrare a fost elaborată în cadrul proiectului program de stat cu cifrul 20.80009.5007.20.

Referințe

1. GIAEVER, I. & KEESE, C.R. Use of Electric Fields to Monitor the Dynamical Aspect of Cell Behavior in Tissue Culture. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. BME-33, no.2, 1986, pp. 242-247.
2. HUERTAS, G., MALDONADO, A., YÚFERA, A., RUEDA, A., HUERTAS, J.L. The Bio-Oscillator: A Circuit for Cell-Culture Assays. In: *IEEE Transactions on Circuits and Systems II: Express Briefs*, Volume: 62, Issue: 2, 2015, pp. 164 – 168.
3. PÉREZ, P., HUERTAS, G., MALDONADO-JACOBI, A., MARTÍN, M., SERRANO, J.A., OLMO, A., DAZA, P., YÚFERA, A. Sensing Cell-Culture Assays with Low-cost Circuitry. In: *Scientific Reports, Nature*, 2018, 8841.
4. ZHANG, X., WANG, W., JANG, S. The Modeling, Design, Fabrication, and Application of Biosensor based on Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) Technique in Environmental Monitoring. In: *Environmental Biosensors*, 2018, Chapter 3.
5. LAIA, Y. T., CHUB, Y. S., LOC, J. C., HUNGA, Y. H., LOA, C.M. Effects of electrode diameter on the detection sensitivity and frequency characteristics of electric cell-substrate impedance sensing. In: *Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier*, 2019, pp. 707-715.
6. The ECIS Method, Applied Biophysics. [online]. [accesat 20.01.2021]. Disponibil: <https://www.biophysics.com/whatIsECIS.php>
7. BORKHOLDER, D. A. *Cell-Based Biosensors Using Microelectrodes*. PhD Thesis, Stanford University, 1998.
8. KASIVISWANATHAN, U., PODDAR, S., KUMAR, C., JIT, S., KUMAR MAHTO, S., SHARMA, N. A portable standalone wireless electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) system for assessing dynamic behavior of mammalian cells. In: *Journal of Analytical Science and Technology*, 2020, vol. 11, 25.