

## Kondensatory grzebieniowe z miedzi do monitorowania funkcji życiowych komórek hodowlanych

**Streszczenie.** Celem przeprowadzonych prac badawczych było określenie wpływu miedzi na wzrost hodowli komórek podczas badania *in vitro*. Dodatkowo, sprecyzowanie w jakich warunkach wykorzystanie danego materiału będzie wystarczające i pozwoli na otwarcie nowych ścieżek rozwoju. W ramach prac badawczych zaprojektowano i wykonano kondensatory grzebieniowe z miedzi na biokompatybilnych podłożach. Warstwy metalizacji osadzono metodą rozpylania magnetronowego na różnego rodzaju materiałach. Najlepsze rezultaty uzyskano na podłożach z poliwęglanu, spełniając wszystkie, wcześniej określone wymagania, m.in. biokompatybilność oraz wytrzymałość na wykorzystywane podczas prac technologicznych roztwory chemiczne. Zaprojektowaną geometrię kondensatorów grzebieniowych uzyskano w procesie fotolitografii. Wytworzone struktury testowe wykorzystano do monitorowania wzrostu hodowli komórek odzwierzcących, za pomocą pomiarów parametrów elektrycznych. Uzyskane wyniki pozwalają na ocenę możliwości wykorzystania miedzi w różnorodnych zastosowaniach biotechnologicznych.

**Abstract.** The target point of the research work was to determine the effect of copper on the growth of cell culture during *in vitro* testing. In addition, specifying under which conditions the use of a given material will be more appropriate and sufficient, will allow opening new development paths. For this purpose, copper comb condensers were designed and made on biocompatible substrates. The metallization layers were deposited by magnetron sputtering on various materials. The best results were obtained on polycarbonate substrates, meeting all the previously specified requirements, including biocompatibility and durability of chemical solutions used during technological works. The designed geometry of comb capacitors was obtained in the photolithography process. The generated test structures were used to monitor the growth of zoonotic cell culture by measuring electrical parameters. The obtained results allow to evaluate the possibilities of using copper in various biotechnological applications. **Copper comb capacitors for monitoring the life functions of the cultured cells**

**Słowa kluczowe:** kondensator grzebieniowy, miedź, ECIS, pomiar impedancji komórek.

**Keywords:** MEMS, Comb capacitor, Copper, ECIS, Cell impedance measurement

### Pomiar impedancji hodowli komórek

Analiza cyklu życia komórki, od adhezji poprzez wzrost do uzyskania w pełni konfluentnej hodowli, aż do obumarcia komórki jest możliwa dzięki wykorzystaniu techniki pomiaru impedancji komórek w czasie rzeczywistym. Metoda ta będąca znakomitą alternatywą dla prac prowadzonych przy zastosowaniu mikroskopów, w których wyniki otrzymuje się na podstawie obserwacji. Została ona wykorzystana w wielu badaniach, między innymi w diagnozowaniu inwazyjnego charakteru komórek nowotworowych, funkcji barierowej komórek śródbłonna, toksyczności testów *in vitro* będących środkiem zastępczym dla testów na zwierzętach oraz transdukcji receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR - ang. *G Protein-Coupled Receptor*) w celu odkrywania nowych leków [3-5].

Badanie bioimpedancji polega na zmierzeniu impedancji tkanek, przez które jest przepuszczany prąd elektryczny o niskim natężeniu ( $\leq 1$  mA). Komórkę można ideowo przedstawić jako równoległe połączenie kondensatora oraz rezystora. W tym przypadku rezystancja ( $R$ ) opisuje opór dla przepływu prądu przez komórkę, podczas, gdy pojemność ( $C$ ) opisuje rozdzielanie się elektronów w izolowanej podwójnej warstwie błony komórkowej, co powoduje polaryzację. W związku z tym, że ciało nie jest jednolitym walcem, a jego oporność i pojemność elektryczna są zmienne, poszczególne tkanki mają swoiste właściwości w zakresie przewodzenia elektrycznego. W szczególności znaczenie w przewodzeniu prądu ma woda wraz z rozpuszczonymi w niej elektrolitami [4, 6].

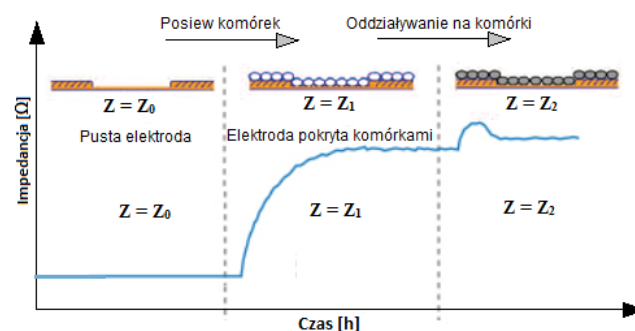
Pomiar impedancji komórek w czasie rzeczywistym jest możliwy dzięki zastosowaniu systemu ECIS<sup>®</sup> (ang. *Electric Cell-substrate Impedance*). Zbudowany jest w oparciu o układ elektrod z cienkiej warstwy metalizacji, osadzonych na biokompatybilnym podłożu takim jak np. poliwęglan. Hodowla komórkowa wraz z niezbędną pożywką nanoszona jest bezpośrednio na powierzchnię elektrod, a polimer izolujący ogranicza obszar badania do określonej geometrii [3, 5].

Naniesienie komórek na elektrody badawcze na matrycy ECIS<sup>®</sup> powoduje w pewnym zakresie częstotliwości (od

100 Hz do 100 kHz) wzrost impedancji. Rosnące na powierzchni elektrody komórki stają się izolatorami, których rezystancja jest zależna od morfologii, adhezji oraz liczby komórek na elektrodzie. Przy względnie niskich częstotliwościach ( $< 2$  kHz) większość prądu przepływa przez przestrzenie międzykomórkowe, pod i pomiędzy sąsiednimi komórkami. Natomiast, przy stosunkowo wysokich częstotliwościach ( $> 40$  kHz) następuje przepływ bezpośrednio przez przestrzenie komórkowe (przez błony komórkowe). Pomiar impedancji przy niskiej częstotliwości dostarcza informacji związanych ze stabilnością adhezji komórek. Użycie wysokiej częstotliwości podczas pomiarów dostarcza informacji na temat stopnia pokrycia elektrod przez komórki [3, 4, 7, 8].

Wyszczególnić można 3 charakterystyczne stany (Rys. 1):

- niepokryta komórkami elektroda – stała wartość impedancji ( $Z_0$ );
- inokulacja komórek na powierzchnię elektrody, wzrost komórek do momentu uzyskania konfluentnej hodowli – wzrost impedancji aż do momentu uzyskania odpowiedniego ustabilizowanego poziomu ( $Z_1$ );
- badania wpływu różnych stymulantów na hodowlę komórek – monitorowanie zmian impedancji w stosunku do poziomu konfluentnej hodowli ( $Z_2$ ).



Rys.1. Oczekiwana charakterystyka impedancji badanej hodowli komórek w funkcji czasu [9]

### Wykorzystanie miedzi w aplikacjach medycznych

Szukając alternatywy dla obecnie wykorzystywanego złota, stosowanego aktualnie w płytkach pomiarowych do badania parametrów elektrycznych komórek w systemie ECIS, w niniejszej pracy skupiono się na interesującym metalu jakim jest miedź (Cu). Wyboru dokonano ze względu na doskonałe właściwości elektryczne, dzięki czemu jest najczęściej wykorzystywanym materiałem w układach elektronicznych. Ponadto, miedź jest niezbędnym elementem wielu procesów biologicznych. Jako metal przejściowy, zdolny jest do przechodzenia między dwoma stanami redoks, utlenionym Cu (II) i zredukowanym Cu (I). Pozwala to białkom zawierającym Cu odgrywać istotną rolę jako nośniki elektronów i katalizatory redoks w organizmach żywych. Praktycznie wszystkie organizmy wykorzystują miedź jako katalityczny kofaktor do procesów biologicznych, takich jak oddychanie, transport żelaza, ochrona przed stresem oksydacyjnym, wytwarzanie hormonów peptydowych, pigmentacja, krzepnięcie krwi oraz prawidłowy wzrost i rozwój komórek. Jej najważniejsze funkcje związane są z udziałem w silnej aktywności redoks. Właściwość ta umiejscawia miedź w wyjątkowej roli kluczowego modulatora szlaków transdukcji sygnału komórkowego. Dodatkowo miedź bierze udział również w wielu enzymatycznych procesach metabolizmu kości i ich tworzenia. Ponadto, Cu posiada pożądane właściwości przeciwbakteryjne wobec szerokiej gamy bakterii, ze względu na główny mechanizm inaktywacji centralnych szlaków katabolicznych i biosyntetycznych. Co więcej, w porównaniu ze zwykłymi środkami przeciwbakteryjnymi, takimi jak srebro (Ag) i cynk (Zn), miedź zapewnia najlepszy kompromis między właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi a cytotoksycznością. Stwierdzono również, że Cu jest często stosowany jako materiał wzmacniający i może być dodawany do stali nierdzewnej w celu zwiększenia jej odporności na korozję. Niestety, po przekroczeniu pewnego progu stężenia, miedź dla komórek jest nieco toksyczna. Aby uniknąć toksyczności wolnych jonów Cu, wewnątrzkomórkowe stężenie miedzi regulowane jest przez dedykowane białka, ułatwiające jego pobieranie, przepuszczanie, jak również dystrybucję do białek docelowych i enzymów zależnych od Cu. Właściwość to umożliwia wykorzystanie miedzi do zastosowań biomedycznych [10-15].

### Technologia struktur cienkowarstwowych

W ramach omawianej pracy wykonano, zaprojektowane wcześniej, maski technologiczne wykorzystane podczas procesu fotolitografii. Następnie wytworzono płytki z metalizacją miedzi, za pomocą napyłarki NANO 36™ firmy Kurt J. Lesker®. W procesie fotolitografii, uzyskano zespół elektrod o strukturze grzebieniowej, wykorzystywanych do pomiaru impedancji komórek w czasie rzeczywistym in vitro.

Pierwszym etapem prac było opracowanie kształtu elektrody do pomiaru impedancji komórek. Wzorując się na obecnie wykorzystywanych konfiguracjach zdecydowano, iż najlepszym wyborem będą elementy grzebieniowe. Ich szerokie zastosowanie pozwala na wykonywanie wielu różnorodnych typów badań. Wynikiem prac był projekt maski z ośmioma elektrodami znajdującymi się na pojedynczym biokompatybilnym podłożu. Po sekwencji eksperymentów zdecydowano, że dalsze etapy prac rozwojowych nad płytkami do pomiaru impedancji komórek prowadzone będą na kondensatorach grzebieniowych o wymiarach 200 µm × 200 µm. Jako podłoża do osadzenia metalizacji wykorzystano szkło laboratoryjne, polistyren (PS), politereftalan etylenu (PET) oraz poliwęglan (PC). Głównym wymogiem było, aby materiał nie wpływał

negatywnie na organizmy żywe i był obojętny dla koniecznych płynów technologicznych. Ostatecznie podłożem, które spełniło wszystkie wymagania i umożliwiło swobodne jego stosowanie okazał się poliwęglan. Po doborze odpowiedniego podłoża spełniającego wszystkie stawiane wymagania i osadzeniu metalizacji miedzi, następnym etapem prac związanych z wykonaniem płytek badawczych, było przeprowadzenie procesu fotolitografii. W tym celu wykonano płytki badawcze na podłożu z poliwęglanu, na których w procesie rozpylania magnetronowego osadzono warstwy miedzi o grubości od 0,1 do 1,0 µm.

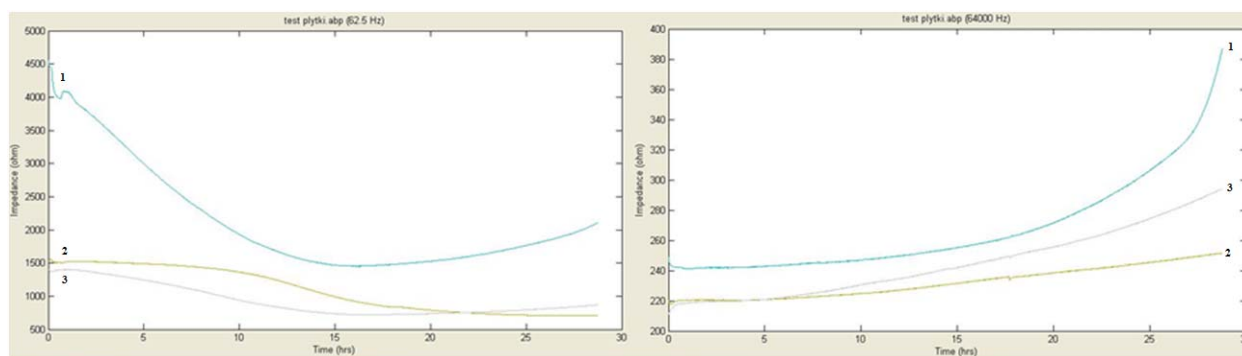
W celu przygotowania wykonanej płytki do badań, na elektrodach umieszczane są specjalne pojemniki, do których aplikowane są badane związki organiczne. Ich przyłączenie następuje przez użycie biokompatybilnego sylikonu. Aby całość była sterylna, gotowe płytki z zatwierdzonymi studzienkami poddaje się bakterio-bójczemu działaniu promieniowania ultrafioletowego. Tak przygotowany komplet służy do hodowli komórek i prowadzeniu na nich badań pozwalających na pomiar impedancji oraz określenie wynikających z jej wartości zależności. Dzięki temu, iż rezystancja doprowadzeń znajdujących się na płytce badawczej nie przekraczała kilku omów, przeprowadzono pierwsze testy z zastosowaniem systemu ECIS®. Podłoża, z przymocowanymi wcześniej pojemniczkami, zostały zamontowane w specjalnym uchwycie sprzężonym z dedykowanym oprogramowaniem, umożliwiającym połączenie elektryczne do elektrod (Rys. 2).

W trzech studzienkach umieszczona została pożywka zawierająca MEM Eagle (Pan-Biotech), uzupełniona o 10% FBS Good HI (Sigma-Aldrich) i antybiotyki (100 IU/ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny, 25 µg/mL amfoterycyny B, Pan-Biotech). Po 24 godzinach w jednej z nich umieszczono komórki z linii mysich fibroblastów - klon 929 NCTC [komórka L, L-929, pochodna szczepu L] (ATCC® CCL-1™) pochodzące z American Type Culture Collection. Hodowlę monitorowano przez 28 godzin, w trakcie której wykonano pomiary impedancji komórek znajdujących się w otoczeniu pożywki.

Na charakterystykach przedstawionych na rys. 3 ukazano przebieg zmierzonej impedancji w funkcji czasu przy skrajnych częstotliwościach (62,5 Hz oraz 64 kHz). Linia niebieską oznaczono studzienkę zawierającą fibroblasty, natomiast linie beżowa i szara wyznaczają impedancję odniesienia - studzienki zawierające jedynie pożywkę (bez hodowli komórek).



Rys.2. Zestaw elektrod umieszczonych w uchwycie systemu ECIS®



Rys.3. Wyniki pomiaru impedancji dla częstotliwości 62,5 Hz oraz 64 kHz, podczas hodowli komórek (linia niebieska) oraz pomiaru impedancji odniesienia dla pożywki bez hodowli (linie brązowa i szara)

## Podsumowanie

W ramach pracy zaprojektowano i wykonano struktury zawierające kondensatory grzebieniowe z miedzi na podłożu z poliwęglanu. Konstrukcja przyrządów umożliwia zamontowanie ich w systemie ECIS<sup>®</sup> do monitorowania parametrów elektrycznych podczas hodowli komórek. Uzyskano poprawne struktury na podłożu z poliwęglanu z warstwą metalizacji miedzi, które posłużyły do przetestowania ich podczas eksperymentu. Wstępne wyniki pomiarów na płytkach wykazały, iż możliwe jest przeprowadzenie hodowli. Nie zaobserwowano problemów z namnażaniem się komórek na płytkach badawczych. Wygenerowane zostały wykresy na podstawie otrzymanych wartości pomiaru impedancji oraz pojemności przy różnych wartościach częstotliwości. Okazało się, że ich charakter jest zbliżony do wykresów obrazujących wyniki uzyskane podczas badań na płytkach z metalizacją złota, które są punktem odniesienia. Otrzymane rezultaty wskazują, iż przyrządy zostały wykonane poprawnie pod względem technologicznym i elektrycznym.

**Autorzy:** dr inż. Andrzej Kociubiński, Politechnika Lubelska, Wydział Elektrotechniki i Informatyki, Instytut Elektroniki i Techniki Informatycznych, ul. Nadbystrzycka 38a, 20-618 Lublin; mgr inż. Dawid Zarzeczny, Politechnika Lubelska, Wydział Elektrotechniki i Informatyki, Instytut Elektroniki i Techniki Informatycznych, ul. Nadbystrzycka 38a, 20-618 Lublin; mgr inż. Maciej Szypulski, Politechnika Lubelska, Wydział Elektrotechniki i Informatyki, Instytut Elektroniki i Techniki Informatycznych, ul. Nadbystrzycka 38a, 20-618 Lublin.

## LITERATURA

- [1] H.J. Rack JIQ: Titanium alloys for biomedical applications. In.: *Materials Science and Engineering C* 26 (2006), 1269 – 1277
- [2] R. Beck: *Technologia krzemowa*. In.: PWN; (1991)
- [3] Prendecka M. MR, Małecka-Massalska T.: Effect of exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* on the electrical properties of mouse fibroblast cells line L929 culture using an electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). In., Vol 23: *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*; (2016), 293-297
- [4] Judith A. Stolwijk KM, Christian W. Renken, Mohamed Trebak: *Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements* | SpringerLink. (2018)
- [5] Luong JHT: *An Emerging Impedance Sensor Based on Cell-Protein Interactions: Applications in Cell Biology and Analytical Biochemistry*. <http://dxdoiorg/101081/AL-120026565> 2011
- [6] Szulcek R, Bogaard HJ, van Nieuw Amerongen GP: Electric Cell-substrate Impedance Sensing for the Quantification of Endothelial Proliferation, Barrier Function, and Motility. In: *J Vis Exp*. 2014
- [7] Wegener J, Keese CR, Giaever I: Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces. *Experimental Cell Research* (2000), 259(1):158-166
- [8] Pennington MR, Walle GRVd, Smith GA: *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing To Monitor Viral Growth and Study Cellular Responses to Infection with Alpha herpesviruses in Real Time*. (2017)
- [9] Ramasamy S, Bennet D, Kim S: Drug and bioactive molecule screening based on a bioelectrical impedance cell culture platform. In: *Int J Nanomedicine*. vol. 9; 2014: 5789-5809
- [10] S. Puig DJT: Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. In., vol. 6 (2): *Curr. Opin. Chem. Biol.*; (2002), 171-180
- [11] Matson Dzebo M AC, Wittung-Stafshede P: Extended functional repertoire for human copper chaperones. In., Vol. 7. *Biomol Concepts*; (2016), 29-39
- [12] A. Grubman ARW: Copper as a key regulator of cell signalling pathways. In., Vol. 16. *Expert Rev Mol Med*; (2014)
- [13] Blockhuys S, Wittung-Stafshede P: Copper chaperone Atox1 plays role in breast cancer cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2017), 483(1):301-304
- [14] He X, Zhang G, Wang X, Hang R, Huang X, Qin L, Tang B, Zhang X: Biocompatibility, corrosion resistance and antibacterial activity of TiO<sub>2</sub>/CuO coating on titanium. *Ceramics International* (2017), 43(18):16185-16195
- [15] Huang Y, Hao M, Nian X, Qiao H, Zhang X, Zhang X, Song G, Guo J, Pang X, Zhang H: Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition. *Ceramics International* (2016), 42(10):11876-11888