

doi:10.15199/48.2022.02.16

Zastosowania wybranych metali w przyrządach do monitorowania kultur in vitro

Streszczenie. W pracy opisany został problem związany z wysokimi nakładami koniecznymi do prowadzenia badań medyczno-biologicznych. Zaproponowano możliwość zastosowania niestandardowych rozwiązań poprawiających efektywność kosztową prowadzenia eksperymentów in vitro metodą pomiaru impedancji elektrycznej. Opisano opracowane matryce z elektrodami wykonanych z różnych materiałów do pomiaru impedancji elektrycznej komórek in vitro. Pomiar przeprowadzono wykorzystując komórki mysich fibroblastów L929 z użyciem płytek z elektrodami z Cu, Ti, NiCr i Ni. Posłużyły one do oceny wpływu danego materiału na hodowlę komórek i próbe określenia możliwości ich zastosowania w eksperymentach medyczno-biologicznych.

Abstract. The paper describes the problem related to the high costs necessary to conduct medical and biological research. The possibility of using non-standard solutions improving the cost-effectiveness of conducting in vitro experiments using the electrical impedance measurement method was proposed. The developed matrices with electrodes made of various materials for the in vitro measurement of cell electrical impedance are described. Measurements were performed using mouse L929 fibroblast cells using plates with Cu, Ti, NiCr and Ni electrodes. They were used to assess the effect of a given material on cell culture and to attempt to determine the possibility of their use in medical and biological experiments. (**Application of selected metals in instruments for in vitro culture monitoring**).

Słowa kluczowe: aplikacje biomedyczne, materiały przewodzące, bioimpedancja, biokompatybilność

Keywords: biomedical applications, conductive materials, bioimpedance, biocompatibility

Wstęp

Wybór materiału przeznaczanego do wykorzystania w aplikacjach biomedycznych jest procesem wymagającym. Oczekiwanym rezultatem jest dobór materiału, który spełnia stawiane wymagania oraz jego użycie jest opłacalne z ekonomicznego punktu widzenia. Zgodnie z tym, kryteria techniczne powinny iść w parze z efektywnością kosztową gotowego wyrobu. Materiał przeznaczony do wykorzystania w urządzeniach biomedycznych winien posiadać odpowiednie właściwości fizyczne i mechaniczne, a jego obróbka powinna być stosunkowo prosta. Dodatkowo, dobór ograniczony jest koniecznością stosowania materiałów biokompatybilnych [1].

Tabela 1. Zestawienie cen wybranych źródeł materiałów osadzanych w procesach fizycznego osadzania z fazy lotnej

Materiał	Cena źródła materiału [Euro]	Objętość źródła materiału [mm ³]	Cena 1 mm ³ źródła materiału [Euro]
srebro	230,35	6435,19	0,0358
aluminium	89,10	6435,19	0,0138
złoto	3072,00	3217,59	0,9548
kobalt	76,50	3217,59	0,0238
chrom	131,00	3217,59	0,0407
miedź	150,40	12870,37	0,0117
żelazo	92,65	3217,59	0,0288
nikiel	121,50	6435,19	0,0189
chromo-nikielina	180,00	6435,19	0,0280
żelazo-nikiel	171,70	6435,19	0,0267
pallad	1468,80	3217,59	0,4565
platyna	3294,72	3217,59	1,0240
azotek krzemu	868,50	6435,19	0,1350
ditlenek krzemu	290,70	6435,19	0,0452
tytan	116,10	6435,19	0,0180

W 2019 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków FDA (ang. *U.S. Food & Drug Administration*) przedstawiła artykuł dotyczący reakcji biologicznych na implanty metalowe [2]. Ukazany został obecny stan wiedzy na temat zagrożeń płynących z wykorzystania niektórych materiałów w urządzeniach przeznaczonych do działania w bliskim kontakcie z organizmem ludzkim. Jednym z głównych wniosków było stwierdzenie, że badania nad

niepożądanym wpływem materiałów metalowych na organizm ludzki powinny być w dalszym ciągu prowadzone. Na podstawie regularnego przeglądu najnowszych dowodów naukowych, FDA ogłosiło, że nadal brak dostatecznych informacji dotyczących zagrożeń i korzyści wynikających z użycia niektórych metali (m.in. stali nierdzewnej, nintolu). Mimo, że większość pacjentów z wszczepialnymi urządzeniami wykonanymi z tych materiałów nie doświadcza żadnych niekorzystnych skutków zdrowotnych, nadal odkrywano są pojedyncze przypadki, w których długotrwały wpływ materiałów w niektórych wyrobach medycznych (m.in. płytkach stabilizacyjnych i stentach) powoduje wystąpienie reakcji niepożądanych [3].

Innym powodem, dla którego warto prowadzić badania nad wpływem materiałów na obiekty pochodzenia biologicznego, jest określenie możliwości wykorzystania danych materiałów w tanich testach POC (ang. *Point Of Care*). Pozwoliłoby to na dostęp do badań w miejscach, w których dostęp do infrastruktury opieki zdrowotnej jest mocno ograniczony. Testy takie umożliwiłyby także szybsze rozpoczęcie terapii po zdiagnozowaniu choroby w domowym zaciszu lub innym dogodnym i łatwo dostępnym miejscu, nie wymagając przy tym obecności wykwalifikowanego personelu i specjalistycznej aparatury laboratoryjnej. Obecnie, podobne testy opracowywane są z myślą o gospodarkach prężnie rozwijających się (tj. Indie i Chiny), w których zapotrzebowanie na cenowo przystępne metody diagnostyki takich chorób, jak gruźlica, malaria i HIV notuje stałą tendencję wzrostową. Aby jednak istniała możliwość rozpowszechnienia dostępu do tego rodzaju badań, konieczne jest poszukiwanie materiałów zapewniających obniżenie kosztów produkcji m.in. jednorazowych testów, przy zachowaniu ich wysokiej czułości i niezawodności.

Mimo, że istnieje technologia umożliwiająca produkcję różnego rodzaju urządzeń medycznych z przystępnych cenowo materiałów (wytwarzanie przystosowane), samo jej użycie jest kosztowne. Z tego powodu, uwagę należy kierować na optymalizację ogólnie dostępnych procesów wytwarzania i ich wykorzystanie z użyciem popularnych i tanich materiałów [4].

Zazwyczaj prace naukowe poświęcone różnego rodzaju bioczytnikom służącym do wykrywania obecności różnych substancji bądź pomiarze ilości występujących związków, pomijają bardzo istotną kwestię związaną z czynnikiem ekonomicznym. Łatwość produkcji oraz cena nie są omawiane, a cała uwaga skupiona jest na parametrach samego urządzenia. Poprawna analiza badanych płynów biologicznych lub właściwości komórek jest niezmiernie ważna. Jednak poszukując tańszych alternatyw konieczne jest poznanie możliwości wykonania podobnego urządzenia, posiadającego zbliżoną funkcjonalność przy osiągnięciu korzystniejszego wyniku finansowego [5]. Jednym z rozwiązań jest zastąpienie drogich materiałów (np. złoto, platyna) tańszymi materiałami, które mogą mieć niższą biogodność, lecz w konkretnym zastosowaniu nie wpływa to znacząco na jakość wykonanych pomiarów. Jest to szczególnie ważne w przypadku przyrządów, które są jednorazowego użycia bądź takich, w których pomiar trwa bardzo krótko i wpływ zastosowanego materiału na otrzymane wyniki jest pomijalny.

Przedmiot badań

Głównym powodem podjęcia tematyki badawczej był aspekt ekonomiczny obecnie wykorzystywanych technologii i materiałów w aplikacjach biomedycznych. Diagnozowanie oraz wykrywanie zmian komórkowych wpływających na powstawanie różnego rodzaju chorób lub innych zjawisk i procesów niepożądanych jest jednym z najprężniej rozwijających się obszarów badań. Naukowcy od lat udoskonalają różnego rodzaju metody badań nad organizmami żywymi, jednak głównie od strony opracowywania nowych metod biologicznych. Celem podjętych prac badawczych było opracowanie rozwiązania, które pozwoliłoby na prowadzenie eksperymentów medyczno-biologicznych przy niższym nakładzie finansowym na przykładzie monitorowania aktywności hodowli komórkowej metodą pomiaru impedancji elektrycznej.

Obecnie, do oceny biokompatybilności materiałów wykorzystywane są różne metody analityczne. W ramach przeprowadzonych eksperymentów wykorzystano metodę bazującą na analizie wartości impedancji elektrycznej hodowli komórek, zmierzonych w obecności elektrod wykonanych z materiałów przewodzących. Elektroda jest strukturą wykonaną w cienkiej warstwie metalu. Służy do pomiaru zmiany wartości rezystancji, impedancji oraz pojemności mieszaniny złożonej z komórek i substancji, w której są one hodowane. Płytką zawierającą zestaw elektrod nazywana jest matrycą pomiarową. Aktualnie, komercyjnie stosowane matryce testowe zawierają elektrody wykonane ze złota lub platyny. Jednak, ich wysoka cena powoduje, że prowadzenie badań na szeroką skalę jest znacząco ograniczone. Tym bardziej, że są to matryce jednorazowego użytku. Aby zwiększyć dostęp do powszechnego korzystania z tej metody, podjęto próbę określenia możliwości zastosowania tańszych materiałów, redukując tym samym niezbędne koszty prowadzenia eksperymentów. Celem było użycie innych metali do budowy matryc kompatybilnych z systemem pomiarowym ECIS® Z-Theta, których użycie umożliwiłoby prowadzenie badań nad komórkami żywymi in vitro. Zastosowanie matrycy z elektrodami z innych materiałów pozwoli zbadać zachowanie komórek hodowanych w bezpośredniej obecności danego metalu. Przy użyciu metody pomiaru impedancji elektrycznej miała zostać określona potencjalna możliwość wykorzystania konkretnych materiałów. W ramach realizacji założonego celu zdecydowano się na wykorzystanie miedzi (Cu), niklu (Ni), chromonikieliny (NiCr)

i tytanu (Ti). Dobór podyktowany był różnym poziomem biokompatybilności powyższych materiałów [6].

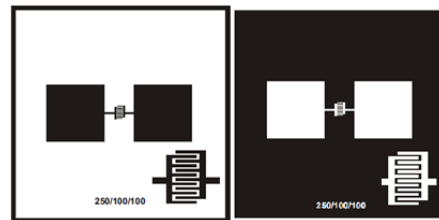
Realizacja prac badawczych

Celem prac było wykonanie struktur umożliwiających prowadzenie badań in vitro z użyciem hodowli komórek przy akceptowalnych kosztach prowadzenia eksperymentów. Koniecznym warunkiem było przeprowadzenie monitorowania hodowli za pomocą pomiaru impedancji elektrycznej, zaś jej wyniki powinny umożliwiać analizę typowych zachowań komórek. W przypadku uzyskania wyników pozwalających na analizę aktywności, reprodukcji i przemieszczania komórek, będzie można uznać, że wykonane przyrządy pozwolą na określenie możliwości ich zastosowania w wybranych aplikacjach.

Wykorzystując metodę analizy parametrów elektrycznych hodowli komórek poprzez pomiar ich impedancji, koniecznym było określenie właściwości, jakimi powinna charakteryzować się płytka testowa. Obecnie stosowane matryce wykonane są w całości z materiałów biokompatybilnych, nieszkodliwych dla komórek. Ponadto, na ich powierzchni znajduje się zwykle warstwa biokompatybilnego dielektryka z niewielkimi otworami. Koszt wykonania matrycy podyktowany jest wieloma czynnikami, w tym: zakup podłoża i metali, wykonanie procesów technologicznych, utrzymanie czystości i sterylizacja produktu, marketing etc. Zastosowanie tańszych metali, zamiast złota czy platyny, mogłoby być znakomitą alternatywą dla wielu zastosowań, a jednocześnie wpłynęłoby znacząco na koszt pojedynczej matrycy.

W pierwszych eksperymentach całkowicie zrezygnowano z warstwy dielektryka, dzięki czemu komórki hodowane posiadają bezpośredni kontakt z materiałem na stosunkowo dużej powierzchni. Umożliwiłoby to w przyszłości użycie wykonanych matryc również do oceny wpływu poszczególnych materiałów na obiekty biologiczne.

Pierwszym etapem prac było zaprojektowanie maski technologicznej płytki zawierającej zestaw elektrod. Bazując na obecnie wykorzystywanych konfiguracjach zdecydowano, że najlepszym wyborem będą struktury grzebieniowe, przedstawione na rysunku 1.

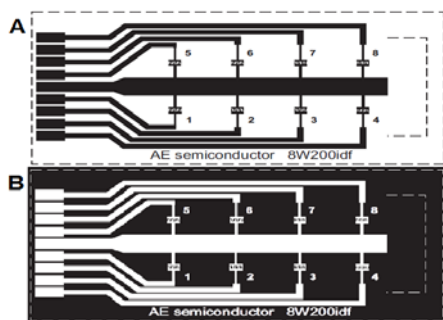


Rys. 1. Maski technologiczne zawierające kondensator grzebieniowy i pola montażowe; w rogu przedstawiono wersję powiększoną kondensatora (wersja pozytywna i negatywna)

Kolejnym krokiem było opracowanie projektu płytki zawierającej zestaw struktur grzebieniowych. Wzorując się na komercyjnych płytkach typu 8W10E, zaprojektowano maskę z ośmioma elektrodami znajdującymi się na pojedynczym podłożu. Dzięki takiemu samemu rozmieszczeniu pinów jak w przypadku standardowych płytek dostarczanych przez producenta sprzętu pomiarowego, wykonany zestaw może zostać zaadaptowany do przeprowadzania eksperymentów w aparaturze systemu ECIS® Z-Theta.

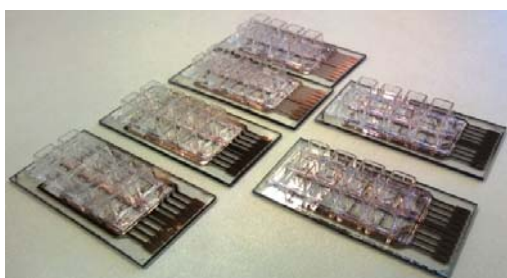
Odległości pomiędzy poszczególnymi palcami kondensatora oraz ich szerokość wynosiła 200 μm . Zaprojektowane maski wykorzystano do przeprowadzenia

procesu fotolitografii zarówno metodą pozytywową (A), jak i negatywową (B) [7,8].



Rys. 2. Maski technologiczne płytek do pomiaru impedancji komórek do wykonania fotolitografii metodą pozytywową (A) i negatywową (B)

Po szeregu eksperymentach, struktury wytworzono stosując metodę „lift-on”, z użyciem pozytywowej emulsji fotoczułej – Positiv 20. Cienkie warstwy metalu osadzono na podłożu poliwęglanowym wykorzystując proces rozpylania magnetronowego przy użyciu napyłarki NANO 36™ firmy Kurt J. Lesker będącej na wyposażeniu Politechniki Lubelskiej. Wzory uzyskano wykorzystując uniwersalny wywoływacz do fotolakierów i płytek pozytywowych AGT-087 lub metakrzemianu sodu pięciowodny. Do trawienia warstw metalizacji użyto nadsiarczanu sodowego B327. Przeprowadzanie eksperymentu metodą negatywową, z powodu konieczności zachowania idealnych proporcji między grubością fotorezystu a napyłonego materiału, wiązałoby się z poniesieniem znacznie większych kosztów, co było sprzeczne z przedmiotem prowadzonych prac.



Rys. 3. Wytworzone matryce pomiarowe

Monitorowanie hodowli komórek z wykorzystaniem wytworzonych matryc

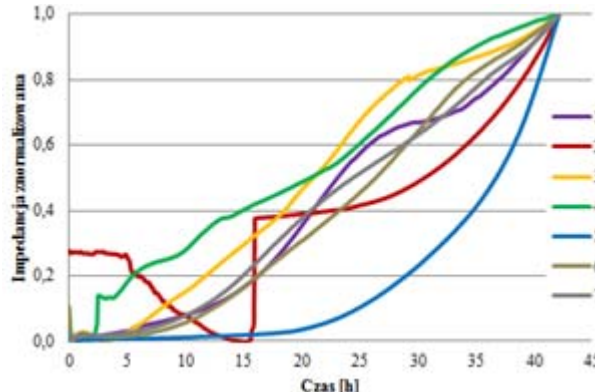
Do badań laboratoryjnych wykorzystano komórki fibroblastów mysich L 929 pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ang. *American Type Culture Collection*, ATCC). Pomiar impedancji przeprowadzono przy częstotliwości 16 kHz. Uzyskane wyniki znormalizowano wykorzystując normalizację min-max wyrażoną wzorem [9]:

$$(1) \quad x' = \frac{x - x_{min}}{x_{max} - x_{min}}$$

gdzie x' to wartość znormalizowana mieszcząca się w przedziale od 0 do 1, natomiast x , x_{min} , x_{max} oznaczają odpowiednio wartość normalizowaną oraz wartość najmniejszą i największą normalizowanego przedziału.

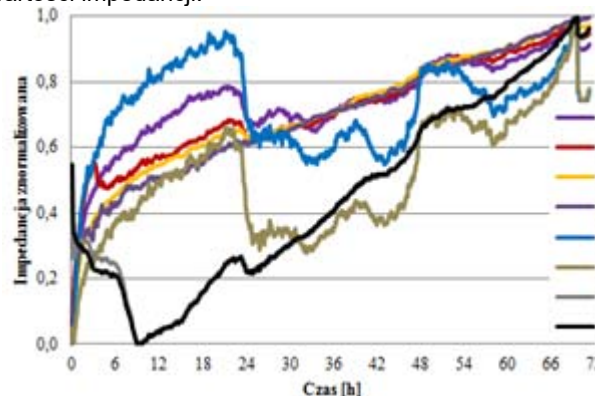
Hodowla komórek przy wykorzystaniu matryc z elektrodami z miedzi zakończyła się sukcesem, a uzyskane dane przedstawione na rysunku 4 pozwoliły na zaobserwowanie zmian spowodowanych aktywnością komórkową. Wyniki uzyskano z siedmiu studzienek, do

których zaaplikowano badane komórki. Mimo toksyczności biologicznej użytego pierwiastka, komórki rozmnożyły się i rozprzestrzeniły po powierzchni elektrod, co widoczne jest w zmianie wartości impedancji. Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowano wzrost wartości impedancji w funkcji czasu.



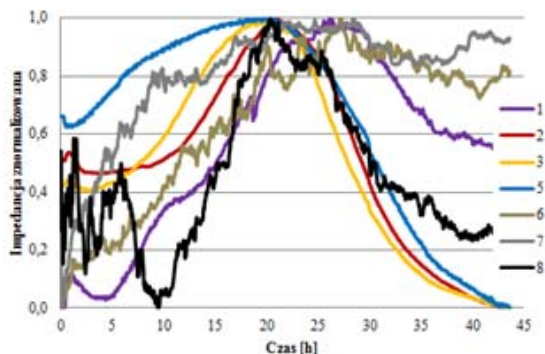
Rys. 4. Wyniki pomiarów impedancji dla 16 kHz przy użyciu matrycy z miedzianymi elektrodami

Matryca z elektrodami wykonanymi z tytanu dostarczyła danych z wszystkich ośmiu studzienek. Widoczne jest to na wykresie znajdującym się na rysunku 5. Charakter zmian zarejestrowany w studzienkach nr 2, 3, 4, 7 odpowiada oczekiwanemu. W studzienkach numer 1, 5, 6, 8 zarejestrowane zachowanie komórek jest trudniejsze do analizy. Widoczne fluktuacje spowodowane były najprawdopodobniej różnymi fazami cyklu życia poszczególnych populacji komórek. Ogólny charakter zmian pozwala stwierdzić, że doszło do proliferacji komórek, czyli ich rozmnożenia i migracji, co widoczne jest w wzroście wartości impedancji.



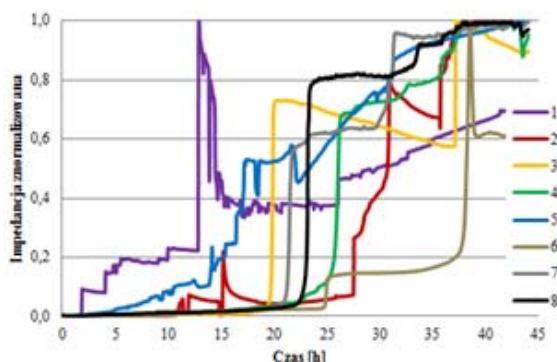
Rys. 5. Wyniki pomiarów impedancji dla 16 kHz przy użyciu matrycy z tytanowymi elektrodami

W matrycy z elektrodami wykonanymi z chromonikieliny nie zadziałała jedna para elektrod (nr 4). Otrzymane charakterystyki przedstawione na rysunku 6, wygenerowane na podstawie uzyskanych wyników, podzielić można na dwie grupy. Pierwsza zawiera wyniki ze studzienek nr 1, 2, 3 i 5, druga zaś ze studzienek nr 6, 7 i 8. W obydwu grupach wartość impedancji rośnie zgodnie z oczekiwaniami wskazując na proliferację komórek. Po fazie wzrostu następuje spadek mierzonej wartości, co oznaczać może naturalne dla cyklu życia komórek obumarcie. Faza ta, czyli apoptoza, związana jest z utratą adhezji martwych komórek do powierzchni elektrod. Różnice widoczne na wykresie wynikają z fluktuacji spowodowanych różnym stopniem aktywności komórkowych oraz dynamiką ich namnażania i rozprzestrzeniania się po powierzchni elektrod.



Rys. 6. Wyniki pomiarów impedancji dla 16 kHz przy użyciu matrycy z elektrodami wykonanymi z chromonikieliny

Podczas eksperymentu z wykorzystaniem płytki z niklowymi elektrodami uzyskano wyniki z wszystkich studzienek, co przedstawione zostało na rysunku 7. W czasie przeprowadzania pomiarów impedancji pojawiły się jednak znaczne, niespotykane wcześniej, zmiany mierzonych wartości. Mimo, że charakter zmian był prawidłowy, krzywe charakteryzowały się dużą nieliniowością. Widoczny wzrost wartości impedancji w czasie wskazywał, że dochodzi do proliferacji i rozprzestrzeniania się komórek. Niepokojące jednak nagłe skoki wartości świadczyły, że podczas hodowli elektrody napotykają na trudności podczas rejestracji zachodzących zmian. Aby zweryfikować przyczyn takiego stanu rzeczy wykonano zdjęcia mikroskopowe struktur po przeprowadzeniu hodowli. W tym celu użyto cyfrowego mikroskopu VHX 5000 firmy Keyence.

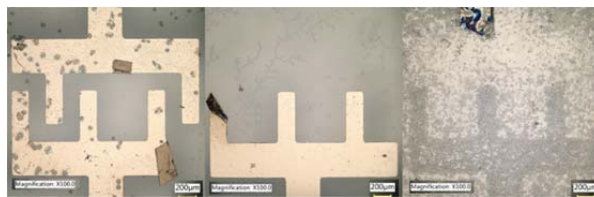


Rys. 7. Wyniki pomiarów impedancji dla 16 kHz przy użyciu matrycy z niklowymi elektrodami

Zdjęcia mikroskopowe ujawniły przyczynę labilności charakterystyk. Okazało się, że podczas eksperymentu elektrody w obecności badanej mieszaniny uległy zniszczeniu. Aktywność komórek powodowała częściowe lub całkowite zniszczenie metalizacji, co widoczne jest na rysunku 8. W czasie trwania pomiarów stopniowa degradacja struktur powodowała zakłócenia mierzonych sygnałów. Objawiało się to niestabilnością w postaci gwałtownych wzrostów mierzonych wartości widocznych na rysunku 7.

Procesy niszczące umożliwiły jednak przeprowadzenie pomiarów. Wskazują na to zarejestrowane zmiany wartości parametrów elektrycznych hodowli komórek. Na wykonanych zdjęciach w miejscach wytrawionych kondensatorów widoczne są obiekty biologiczne biorące udział w eksperymencie. Ich liczba wskazuje, że doszło do ich proliferacji i migracji po powierzchni dna studzienki. Mimo toksyczności niklu, komórki namnożyły się na całym możliwym obszarze, bez względu na to czy była to powierzchnia biokompatybilnego poliwęglanu, czy toksycznego metalu. W sytuacji, gdyby wpływ niklu

blokował wzrost kultur komórkowych występujące komórki znajdowałyby się co najwyżej poza obszarem elektrod [10].



Rys. 8. Rodzaje zniszczeń niklowych elektrod pomiarowych

Podsumowanie

Wyniki parametrów elektrycznych i analiza mikroskopowa wykorzystanych struktur pozwalają stwierdzić, że płytki z elektrodami wykonanymi w metalizacji miedzi, tytanu, chromonikieliny i niklu umożliwiają ich wykorzystanie do eksperymentów z użyciem komórek in vitro. Użyte w eksperymentach komórki L 929 namnożyły się na powierzchni elektrod, dzięki czemu uzyskano zadowalające wyniki wskazujące na zajście cyklu komórkowego. Charakter obserwowanych zmian miał tendencję rosnącą, co świadczy o tym, że materiały nie wpłynęły niszcząco na komórki, umożliwiając ich rozwój. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że możliwe jest obniżenie kosztów prowadzenia wybranych eksperymentów medyczo-biologicznych poprzez zastosowanie tańszych materiałów. Zaznaczyć należy, że aby w pełni poznać potencjał możliwości wykorzystania materiałów przewodzących do zastosowań biomedycznych, konieczne jest dalsze prowadzenie badań w zakresie wpływu materiałów na zachowanie organizmów żywych. Zasadnym wydaje się być użycie tańszych metali w przyrządach jednorazowego użytku lub takich, w których kontakt z substancją pochodzenia biologicznego jest stosunkowo krótki i nie wpływa znacząco na wynik pomiaru.

Autor: mgr inż. Dawid Zarzeczny, Politechnika Lubelska, Wydział Elektrotechniki i Informatyki, Katedra Elektroniki i Technik Informatycznych, ul. Nadbystrzycka 38a, 20-618 Lublin, E-mail: dawid.adrian.zarzeczny@gmail.com

LITERATURA

- [1] Davis J.R., Overview of Biomaterials and Their Use in Medical Devices, *Handbook of Materials for Medical Devices* (2003), 1-11.
- [2] Jeffre E., Shuren M.D., Statement on continued efforts to evaluate materials in medical devices to address potential safety questions | FDA, 2019.
- [3] Metals Used in Medical Devices | FDA, 2020.
- [4] Pai N.P., Vadnais C., Denkinger C., Engel N., Pai M., Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Diversity, Complexity, and Barriers in Low- And Middle-Income Countries, *PLoS Medicine*, 9 (2012), nr 9, e1001306.
- [5] Kucherenko I.S., Topolnikova Y.V., Soldatkin O.O., Advances in the biosensors for lactate and pyruvate detection for medical applications: A review, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 110 (2019), 160-172.
- [6] Stensaas S.S., Stensaas L.J., Histopathological evaluation of materials implanted in the cerebral cortex, *Acta Neuropathologica*, 41 (1978), nr 2, 145-155.
- [7] Kociubiński A., Zarzeczny D., Szypulski M., Kondensatory grzebieniowe z miedzi do monitorowania funkcji życiowych komórek hodowlanych, *Przegląd Elektrotechniczny*, 1 (2018), nr 9, 61-63.
- [8] Zarzeczny D., Projekt i technologia kondensatorów grzebieniowych z tytanu, Politechnika Lubelska, Lublin, 2017.
- [9] Patro S.G.K., Sahu K.K., Normalization: A Preprocessing Stage, *IARJSET* (2015), 20-22.
- [10] Kociubiński A., Zarzeczny D., Szypulski M., Wilczyńska A., Pigoń D., Małecka-Massalska T., Prendecka M., Real-time monitoring of cell cultures with nickel comb capacitors, *Informatyka, Automatyka, Pomiar w Gospodarce i Ochronie Środowiska*, 2 (2020), 32-35.