

УДК 550.35

Н.Г. Крылова¹, Г.В. Грушевская¹, И.В. Липневич¹,
Т.И. Ореховская², Г.Н. Семенкова¹, Н.В. Васильев¹

¹Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, Минск
e-mail: nina-kr@tut.by

²Белорусский государственный университет электроники и информатики,
ул. П.Бровки, 6, 200013, Минск

ИМПЕДАНСНЫЙ СЕНСОР НА ЭФФЕКТЕ ЭКРАНИРОВАНИЯ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МОНОСЛОЕВ

Показано, что при культивировании клеток на поверхности импедансного сенсора наблюдается эффект экранирования электрического поля, связанный с формированием межклеточных контактов и появлением активной составляющей импеданса. Величина эффекта зависит от чувствительности покрытия и возрастает с уменьшением расстояния между электродами сенсора.

Ключевые слова: импедансная спектроскопия, встречно-штыревой нанопреобразователь, клеточный монослой, эффект экранирования.

Введение

Импедансные методы анализа биологических объектов являются перспективными при разработке диагностических тест-систем для медико-биологических приложений [1]. Мониторинг импеданса клеточных монослоев, выращенных или адгезированных на нанобиосенсоре, является дешевым, практичным и неинвазивным методом количественной оценки пролиферации, межклеточной коммуникации, функциональной активности клеток в норме и при воздействиях различных химических соединений, в том числе для оценки их цитотоксического действия [2-4].

В настоящее время импедансные методы исследования клеточных монослоев ориентированы на определение количества клеток в анализируемом образце, что требует длительных промежутков времени, и не позволяет регистрировать ранние функциональные изменения, возникающие в клетках при их стимуляции либо деструкции [1-5].

Регистрация таких изменений требует высокой чувствительности сенсора. В связи с этим актуальным является

усовершенствование метода для экспрессного измерения параметров клеточных монослоев.

Целью работы является изучение влияния структурно-геометрических особенностей емкостного встречно-штыревого преобразователя на его способность детектировать кооперативный характер формирования и функциональность клеточных монослоев.

Материалы и методы

В работе использовалась система пар электродов со встречно-штыревой структурой. Каждая пара, расположенная на ситалловой подложке, представляла собой электрическую емкость "открытого типа".

Геометрические параметры емкостных датчиков были двух типов: (А) датчики с шириной полосы электродов и межэлектродным расстоянием d , равным 25 мкм, и площадью измерительной поверхности S , равной 9 мм²; (Б) датчики с параметрами $d = 50$ мкм и $S = 15$ мм².

Диэлектрическое покрытие алюминиевых электродов датчиков представляло собой слой пористого анодного оксида алюминия с порами диаметром 10 нм, на

который последовательно наносилось пять металлосодержащих монослоев Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) из дифильного олигомера производных тиофена 3–гексадецил–2,5–ди(тиофен–2–ил)–1*H*–пиррол (ГДТП) [6] и два ЛБ-монослоя многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ), которые имели диаметр от 2,5 до 20 нм и длину до 2,5 мкм, были ковалентно функционализированы карбоксильными группами и нековалентно модифицированы молекулами стеариновой кислоты [7].

ЛБ-пленки ГДТП формировались на субфазе, содержащей соли редкоземельных элементов (РЗ): Се ($\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$) или Sm ($\text{Sm}_2(\text{SO}_4)_3$) и/или трехвалентное железо. Используемое отношение концентраций [РЗ] к [Fe] в субфазе равнялось 0 или 0,01.

ЛБ-подслои МУНТ формировались двумя способами – на деионизованной бидисциллированной воде и на субфазе, представляющей собой раствор соли трехвалентного церия.

Регистрацию характеристик датчика проводили методом импедансной спектроскопии. Встречно-штыревые преобразователи включались в импульсно-подстраиваемый RC-автогенератор.

Электрохимические измерения проводились в автоколебательном режиме на частоте квазирезонанса в измерительной кювете с буферной средой [8]. Сбалансированный буферный раствор Эрла содержит 0,12 моль/л NaCl, 5,4 ммоль/л KCl, 0,9 ммоль/л $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,8 ммоль/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 ммоль/л CaCl_2 , 5,6 ммоль/л глюкозы, 26,2 ммоль/л NaHCO_3 («Анализ X», Беларусь).

Клетки глиомы крысы линии С6, полученные из коллекции культур ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии (г. Минск), культивировали на поверхности датчика в модифицированной среде Игла DMEM с добавлением 10 % сыворотки плодов коров и $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл гентамицина при температуре 37 °С.

Визуализация клеточного монослоя проводилась с использованием конфокального микро-Раман-спектрометра фирмы Nanofinder HE («LOTIS-TII», Токио, Япония).

Результаты и обсуждение

Биосовместимость покрытий. Для оценки влияния чувствительных покрытий датчиков на клеточный рост в работе были изучены морфологические характеристики клеток, показанные на рис. 1. Из сравнения рис. 1а и 1б видно, что клетки адгезируют как на электроды, так и заполняют межэлектродное пространство. Клетки контрольного образца, культивируемые на поверхности стекла (рис. 1в), и клетки, культивируемые на датчиках (рис. 1б), имеют схожую звездчатую форму с большим количеством отростков и межклеточных контактов. Это свидетельствует о биосовместимости чувствительных покрытий датчиков с клеточной культурой С6.

Диэлектрическая спектроскопия. Датчики типа А были протестированы для 3 различных типов покрытий: 1) железосодержащая ЛБ-пленка ГДТП и два ЛБ-монослоя МУНТ без Се (покрытие 1), 2) Fe- и Се-содержащая ЛБ-пленка ГДТП и два ЛБ-монослоя МУНТ без Се (покрытие 2), 3) Fe- и Sm-содержащая ЛБ-пленка ГДТП и два ЛБ-монослоя МУНТ без Се (покрытие 3А).

Было показано, что формирование клеточного монослоя на поверхности датчиков А приводит к снижению емкости от 300–500 пФ в отсутствие клеток до 6,5–10 пФ при сформированном клеточном монослое (рис. 2). Этот эффект экранирования характеризовался отношением максимальной разности емкостей без и с клеточным монослоем к емкости без клеток в процентном соотношении, называемом степенью экранирования. Степень экранирования для датчиков А достигала 97 %.

При равных посевных дозах формирование монослоя с возникновением эффекта экранирования на Се-содержащих покрытиях (покрытие 2) наблюдается на 3–4-ые сутки роста клеток в культуре, а на Fe-содержащем покрытии 1 или Sm- и Fe-содержащем покрытии 3А – на 1-ые сутки роста. Степень экранирования для Се-содержащих покрытий (покрытие 2) на 2-ые сутки роста составляет около 38%.

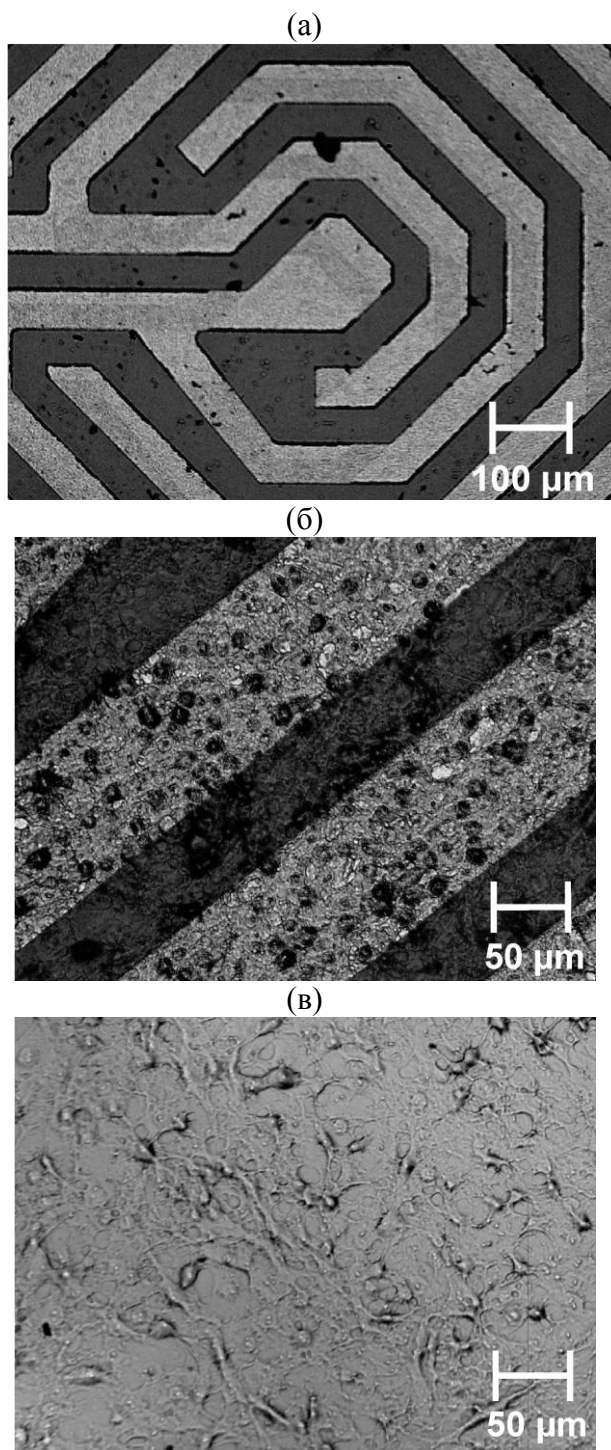


Рис. 1. Фотографії фрагментів сенсора без клітинного моношару (а) і з іммобілізованими клітками (б); Електроди – світлі, підложка – темна. Клітинний моношар на стеклі (в).

На датчики Б наносились покриття 3-х типів: покриття 1 і 2 і Fe-содержаща ЛБ-пленка ГДТП і два Се-содержащих ЛБ-моношарів МУНТ (покриття 3Б).

Оціним величину змінення ємкості сенсора типу Б при зміні концентрації іонів в середі. Згідно закону Максвелла-Гарнетта ємкість датчиків при

їх поглибленні в солевій розчині зростає з ростом концентрації іонів в середі [9]. Найменша ємкість спостерігається для 0,15 моль/л NaCl. При поглибленні датчика в середу Эрла (pH=7,4), не содержащую CaCl₂, ємкість датчика підвищується на 100–200 пФ відносно ємкості датчика в розчині 0,15 моль/л NaCl, а в середі Эрла, маючої CaCl₂ в концентрації 2,5 ммоль/л, спостерігається дальніше підвищення ємкості на 50–150 пФ.

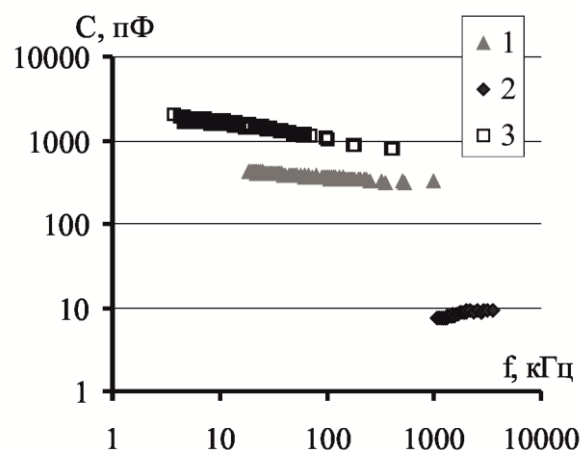


Рис. 2. Типичні частотно-ємкостні характеристики датчиків А в середі Эрла без кліток (1), со сформованим клітинним моношаром (2) і після руйнування кліток (3).

Установлено, що ємкість датчика Б, покриття якого не содержит Се³⁺, зменшується при переводі з середі Эрла в середу Эрла без CaCl₂ на 66 ± 11 пФ, що становить $6,0 \pm 0,5$ % від ємкості датчика в середі Эрла. Для датчиків Б з типом покриття 2 і 3Б відповідні значення рівні 117 ± 27 пФ ($10,7 \pm 0,5$ %) і 80 ± 21 пФ ($8,2 \pm 0,5$ %). Зниження ємкості датчиків Б з типом покриття 1 і 2 при їх переводі з середі Эрла в 0,15 моль/л NaCl становить 23 ± 3 % і 18 ± 3 % від ємкості датчиків в середі Эрла, відповідно.

На рис. 3 представлені типичні частотно-ємкостні характеристики датчиків Б (покриття 1) в залежності від часу росту кліток в культурі. Видно, що ступінь екранування поступово підвищується з ростом щільності клітинного моношару.

Величина ефекта екранування електричного поля датчиків Б з повністю сформованим клітинним

монослоем значительно ниже, чем для датчиков А. Эффект экранирования составляет не более 18 %.

Чувствительность бионаносенсоров, функционирующих на эффекте экранирования, зависит от величины напряженность электрического поля. Чем больше напряженность, тем больше плотность заряда ρ в двойном электрически заряженном слое Гельмгольца. При экранировании электрическое поле внутри проводящей сетки стремится к нулю, и, соответственно, плотность ρ падает, а емкость двойного заряженного слоя уменьшается. Напряженность электрического поля больше в датчиках с меньшими межэлектродными зазорами. Этим объясняется больший эффект экранирования (97 % против 18 %) и соответственная более высокая чувствительность датчиков типа А в сравнении с датчиками типа Б.

Межклеточная щелевая коммуникация и функциональное состояние монослоя Сб. Изменение емкости ΔC сенсора от времени t культивирования клеток определялось по формуле:

$$\Delta C(t) = C_0(t) - C_0(0),$$

где $C_0(0)$ – емкость сенсора в среде без клеток в начальный момент времени $t = 0$.

Изменения емкости датчиков Б при культивировании клеток на их поверхности представлены на рис. 4. Как видно из рис. 4, в лаг-фазе емкость возрастает из-за большого электрического заряда на биомембранах отдельных неконтактирующих друг с другом клеток, адгезирующих на поверхность сенсора.

Возникновение межклеточной щелевой коммуникации сопровождается эффектом экранирования электрического поля сенсора. Кооперативное формирование коммуникационных контактов в монослое клеток на покрытии без Ce^{3+} , происходит после 12 ч роста, в то время как для покрытия 2 снижение емкости датчика наблюдается только на 2-ые, а для покрытия 3Б – на 3-и сутки роста клеток в культуре. Повышение емкости датчиков Б для этих покрытий 2 и 3Б на 1–2-ые сутки роста

клеток свидетельствует о низкой скорости установления межклеточных контактов.

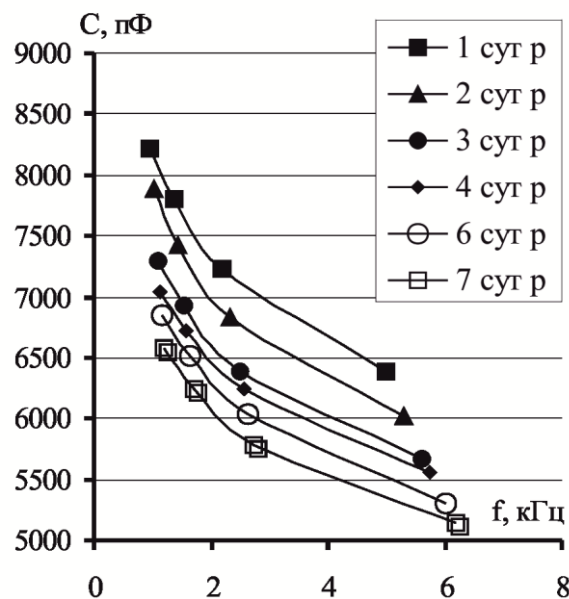


Рис. 3. Частотно-емкостные характеристики датчиков Б с покрытием 1 на разные сутки роста клеток.

Разрушение клеток при воздействии неионного детергента (10% раствор Тритона X-100, "Sigma", США) или нарушение целостности клеточного монослоя при действии трипсина приводит к значительному повышению емкости датчиков (рис. 2).

Емкостные характеристики полностью отмытых от клеток датчиков возвращались к своим первоначальным значениям.

Таким образом, нарушение межклеточной коммуникации, связей клетка-подложка и разрушение клеточной мембраны с последующим высвобождением ионов приводит к исчезновению эффекта экранирования и повышению содержания ионов в среде.

Эффект экранирования обусловлен активной составляющей импеданса клеточного монослоя, возникающей при установлении межклеточных контактов. Как следует из рис. 4, на покрытиях, не содержащих ионов Ce^{3+} , электрическая проводимость у клеточного монослоя появляется раньше по сравнению с Ce -содержащими покрытиями. Это связано с тем, что Ce^{3+} является блокатором кальциевых каналов. Так как щелевая ком-

муникація являється Са-зависимим процесом, то іони церія тормозять установлення міжклеточних контактів в монослоє.

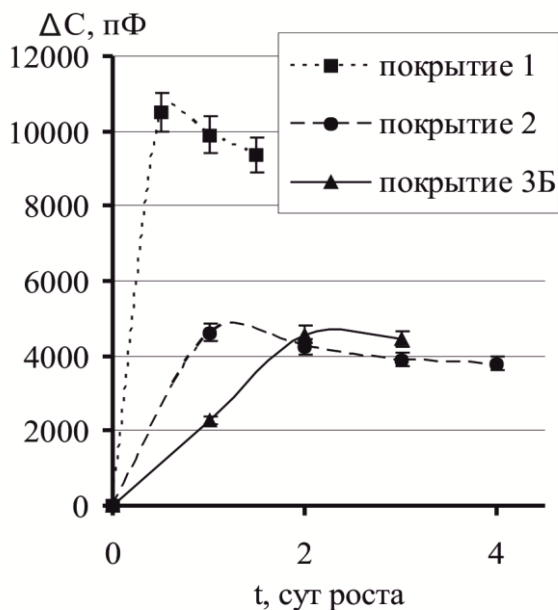


Рис. 4. Зависимость изменения емкости датчиков Б от времени культивирования клеток в монослоє для различных типов чувствительного покрытия.

Число ионов Се, диффундирующих в клеточный монослоє, больше для покрытия 3Б, чем для покрытия 2, как показано на рис. 4. Этот результат устанавливает бóльшую доступность ионов Se^{3+} во

внешнем ЛБ-подслоє с МУНТ, чем во внутреннем ЛБ-подслоє ГДТП.

Поэтому электрическая проводимость клеток после установления межклеточных контактов связана с перераспределением заряженных молекул, таких как отрицательно-заряженные остатки сиаловой кислоты, вдоль плазматических мембран клеток и Са-зависимым индуцированием электроосмотического потока ионов через мембрану.

Заклучение

Формирование межклеточных контактов приводит к появлению активной составляющей импеданса клеточного монослоє.

Выявленный в работе эффект экранирования электрического поля клетками может лежать в основе импедансного сенсора для регистрации функционального состояния клеточных монослоєв.

Величина эффекта возрастает с уменьшением расстояния между электродами сенсора.

Скорость роста клеток и время формирования межклеточной щелевой коммуникации зависит от типа ЛБ-покрытий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Henning T., Brischwein M., Baumann W. et al. Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay // *Anti-Cancer Drugs* – 2001. – V. 12. – P. 21-32.
2. Ceriotti L., Ponti J., Colpo P. et al. Assessment of cytotoxicity by impedance spectroscopy // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V. 22. – P. 3057-3063.
3. Yeon J.H., Park J.-K. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip // *Anal. Biochem.* – 2005. – V. 341. – P. 308-315.
4. Xiao C., Luong J. On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) // *Biotechnol. Prog.* – 2003. – V. 19. – P. 1000-1005.
5. Ehret R., Baumann W., Brischwein M. et al. On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures // *Med. Biol. Eng. Comput.* – 1998. – V. 36. – P. 365-370.
6. Kel'in A.V., Kulinkovich O.G. A new synthetic approach to the conjugated five numbered heterocycles with long-chain substituents // *Folia pharm. Univ. Carol.* – 1995. – V. 18. – P. 96-97.
7. Grushevskaya H.V., Hrushevsky V.V., Krylova N.G. et al. Cell functioning characterization using spontaneous

polarization hysteresis in thin Langmuir-Blodgett films with modified multi-walled carbon nanotubes and rare-earth atoms // *J. Nonlin. Phen. Com. Sys.* – 2010. – V. 13. – P. 396-408.

8. Абрамов И.И., Грушевский В.В., Крылов Г.Г. и др. Метод расчета встречноштыревого датчика емкостного типа // *Петербургский журнал*

электроники. – 2012. – Т. 4. – № 73. – С. 59-67.

9. Грушевский В.В., Крылов Г.Г., Крылова Г.В. и др. Электрофизические свойства приэлектродного слоя встречно-штыревого датчика на границе раздела фаз нанопористый АОА – полярная жидкость // *Вестник БГУ. Серия 1: Физ. Мат. Информ.* – 2012. – Т. 2. – С. 23-29.

Стаття надійшла до редакції 10.04.2013

N.G. Krylova¹, H.V. Grushevskaya¹, I.V. Lipnevich¹,
T.I. Orekhovskaya², G.N. Semenkova¹, N.V. Vasilyeu

¹Belarusian State University, Nezavisimosti Ave. 4, 220030, Minsk
e-mail: nina-kr@tut.by

²Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics,
P.Brovky Str. 6, 220013, Minsk

IMPEDANCE SENSOR BASED ON SHIELDING EFFECT FOR CELL MONOLAYER FUNCTIONAL STATE DETECTION

It has been established that the electric field shielding effect is observed during cell growth on impedance sensor surface. This effect is caused by cell junction communication formation and arising of impedance real part. An extent of shielding effect depends on sensor sensitive coat and increases when a width between sensor electrodes decreases.

Keywords: impedance spectroscopy, interdigital nanosensor, cellular monolayer, shielding effect.

Н.Г. Крилова¹, Г.В. Грушевская¹, І.В. Ліпневич¹,
Т.І. Ореховская², Г.Н. Семенкова¹, Н.В. Васільєв¹

¹Білоруський державний університет, пр. Незалежності, 4, 220030, Мінськ
e-mail: nina-kr@tut.by

²Білоруський державний університет електроніки та інформатики,
вул. П. Бровкі, 6, 200013, Мінськ

ІМПЕДАНСНИЙ СЕНСОР НА ЕФЕКТИ ЕКРАНУВАННЯ ДЛЯ ДЕТЕКТУВАННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КЛІТИННИХ МОНОШАРІВ

Показано, що при культивуванні клітин на поверхні імпедансного сенсора спостерігається ефект екранування електричного поля, пов'язаний з формуванням міжклітинних контактів і появою активної складової імпедансу. Величина ефекту залежить від чутливості покриття і зростає із зменшенням відстані між електродами сенсора.

Ключові слова: імпедансна спектроскопія, зустрічно-штырьовий наноперетворювач, клітинний моношар, ефект екранування.