

## **РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПРОЦЕССОРНОГО ЧИП-ФОРМАТА НА ОСНОВЕ ИТО МИКРОЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИЙ РАЗДЕЛЕНИЕМ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ КЛЕТОК В ГЕТЕРОГЕННЫХ СУСПЕНЗИЯХ**

<sup>2</sup>Ореховская Т.И., <sup>3</sup>Гудкова Е.И., <sup>1</sup>Драпеза А.И.,  
<sup>2</sup>Лазарук С.К., <sup>1</sup>Лобан В.А., <sup>2</sup>Перко С.Л., <sup>3</sup>Скороход Г.А., <sup>1</sup>Хмельницкий А.И.

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет,  
<sup>2</sup>Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,  
<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск, Республика Беларусь

*На примере смешанных суспензий бактерий *S.aureus* и эритроцитов крови человека показано, что вне зависимости от количества клеток в смешанной суспензии, все исследуемые биопроцессорные чип-форматы, на основе оксида индия-олова (ИТО) микроэлектродов, демонстрируют одни и те же механизмы происходящих электрокинетических биопроцессов, связанных с разделением и концентрированием клеток различного размера. Полученный результат хорошо согласуется с результатами работы [6], из которой следует, что при соответствующем электрическом режиме и частоте 800 Гц клетки крови испытывают отрицательную диэлектрофоретическую силу, которая выталкивает их с поверхности центрального электрода, поскольку она сильнее электрогидродинамической силы, ответственной за перетаскивание клеток за счет электроосмотического потока на переменном напряжении. Показано, что бактерии транспортируются в район центрального электрода за счет электроосмотического потока, поскольку электрогидродинамическая сила для бактерий больше их положительной диэлектрофоретической силы, а выталкивающая клетки крови диэлектрофоретическая сила подтягивает бактерии к середине центрального электрода, где электрогидродинамическая сила является самой слабой, а диэлектрофоретическая и электрофоретическая силы являются самыми большими.*

**Ключевые слова:** биопроцессорный чип-формат, ИТО-микроэлектроды, гибридная электрокинетика, электроосмос, диэлектрофорез, электрофорез, электрогидродинамика.

## **DEVELOPMENT AND RESEARCH OF THE BIOPROCESSOR CHIP FORMAT ON THE BASIS OF ITO MICROELECTRODES FOR MANIPULATION BY SEPARATION AND CONCENTRATION OF CELLS IN HETEROGENOUS SUSPENSIONS**

<sup>2</sup>Orekhovskaya T.I., <sup>3</sup>Gudkova E.I., <sup>1</sup>Drapeza A.I.,  
<sup>2</sup>Lazaruk S.K., <sup>1</sup>Loban V.A., <sup>2</sup>Perko S.L., <sup>3</sup>Skorokhod G.A., <sup>1</sup>Khmelnitsky A.I.

<sup>1</sup>Belarusian State University,  
<sup>2</sup>Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics,  
<sup>3</sup>Belarusian State Medical University,  
Minsk, Republic of Belarus

*Using the example of mixed suspensions of S.aureus bacteria and human erythrocytes, it was shown that regardless of the number of cells in the mixed suspension, all the studied bioprocessor chip formats, based on indium tin oxide (ITO) microelectrodes, demonstrate the same mechanisms of the electrokinetic bioprocesses occurring associated with separation and by concentrating cells of various sizes. The result obtained is in good agreement with the results of [6], from which it follows that with an appropriate electrical mode and a frequency of 800 Hz, blood cells experience a negative dielectrophoretic force, which pushes them out of the surface of the central electrode, because it is stronger than the electrohydrodynamic force responsible for dragging the cells account electroosmotic flow AC voltage. It has been shown that bacteria are transported to the central electrode area due to the electroosmotic flow, since the electrohydrodynamic force for bacteria is greater than their positive dielectrophoretic force, and the dielectrophoretic force pushing blood cells pulls bacteria to the middle of the central electrode, where electrohydrodynamic force is the weakest, and dielectrophoretic and electrophoretic force are the biggest.*

**Keywords:** bioprocessor chip format, ITO microelectrodes, hybrid electrokinetics, electroosmosis, dielectrophoresis, electrophoresis, electrohydrodynamics.

E-mail: drapeza@bsu.by

### **Введение**

Оптически прозрачные электропроводящие пленки на основе оксида индий-олова (ITO, аббревиатура с англ. – indium tin oxide) широко применяются в различных областях электроники и техники [1, 2]. Формирование такого рода покрытий представляет значительный интерес и для конструирования на их основе недорогих биопроцессорных чип-форматов для биомедицины [3]. Это достигается относительной простотой получения тонких ITO-пленок с помощью магнетронного напыления мишени на основе  $\text{In}_2\text{O}_3$  и  $\text{SnO}_2$  на подложку из стекла. Желаемый компромисс между электропроводностью и прозрачностью пленки ITO на стекле, удовлетворяющий требованиям биопроцессорного чип-формата для биомедицинских применений, может быть обеспечен путем создания ITO пленки определенной толщины и определенной концентрации носителей заряда в ней.

Получение величин электропроводности микроэлектродов ITO-пленок, близких к электропроводности металлов, необходимо для повышения эффективности электрокинетического управления разделением и концентрированием различных клеток в гетерогенных суспензиях, например, бактерий в микрокапле крови. Такой подход позволяет реализовать более быстрый (гибридный или комбинированный) механизм разделения и концентрирования, основанный на электрокинетических принципах манипуляции клетками [4].

Необходимый уровень прозрачности микроэлектродов ITO на стеклянной подложке позволит значительно уменьшить время, снизить трудозатраты и себестоимость проводимых анализов на основе биопроцессорных чип-форматов, поскольку в этом случае исключается необходимость функционализации мембраны исследуемых клеток люминофорами, которые необходимы для визуализации наблюдения за их электрокинетическим транспортом в условиях непрозрачных электродов. Немодифицированные люминофорами клетки не будут изменять электрические режимы и соответствующий

этим режимам порядок их электрокинетического перемещения, установленные в процессе предварительных исследований. Только в этом случае оказывается справедливо понятие биопроцессорного чип-формата, под которым следует понимать, что один и тот же состав гетерогенной суспензии клеток и одни и те же условия электрокинетических манипуляций клетками должны приводить к одним и тем же механизмам биопроцессов (гибридным или комбинированным) по перемещению клеток [3].

**Целью настоящей работы** является разработка и исследование биопроцессорного чип-формата на основе ИТО-микроэлектродов для манипуляций разделением и концентрированием клеток в гетерогенных суспензиях, например бактерий в микрокапле клеток крови человека.

### Материалы и методы исследований

Для проведения экспериментальных исследований использована экспериментальная установка аппаратно-программного типа, показанная на рис. 1,а. Функциональные возможности и характеристики экспериментальной установки приведены в работе [5].

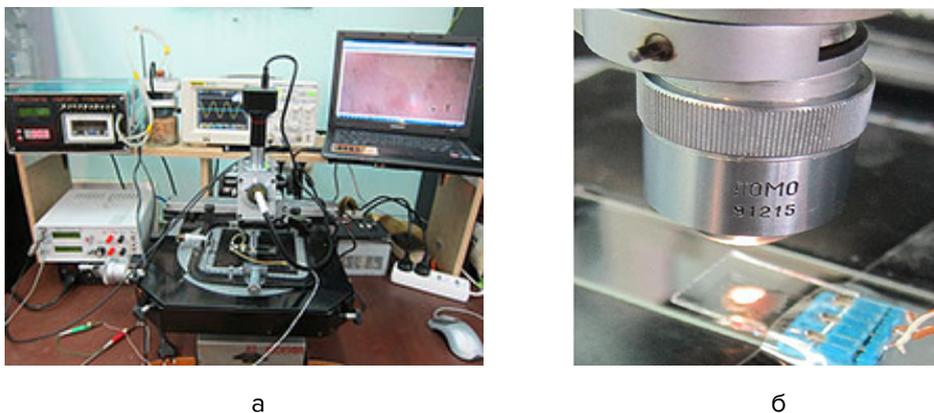


Рис. 1. Фотографии общего вида экспериментальной установки (а) и биопроцессорного чип-формата (б)

Для удобства нанесения в процессе измерений микрокапель объемом от 5 мкл до 20 мкл на чувствительную область чип-формата использовали объектив 6,3X (рис. 1,б), который был сфокусирован вблизи исследуемой микроэлектродной поверхности чип-формата.

Электрические режимы задавались с помощью функционального генератора (ФГ), входящего в состав установки [5]. Обобщенная схема подключения функционального генератора к контактам биопроцессорного чип-формата показана на рис. 2.

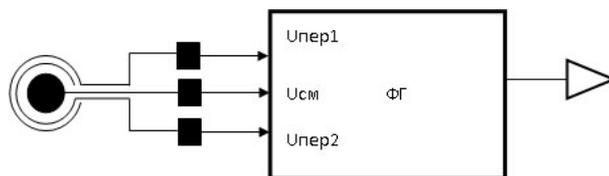


Рис. 2. Схема подключения исследуемого чип-формата к ФГ

Методика работы с экспериментальной установкой состояла в получении видеоматериалов, характеризующих разделение и концентрирование бактерий *S.aureus*, в центральной области биопроцессорного чип-формата. Для последующего анализа проводили конвертирование полученных видеоматериалов в формат «.jpeg» с помощью редактора Free Video to JPG Converter.

Гетерогенную суспензию для проведения экспериментальных исследований по разделению и концентрированию клеток готовили на основе изотонического раствора глюкозы (5 %), имеющего низкую проводимость (6,0 мкСм/см), который использовали в качестве питательной среды для поддержания жизнеспособности бактерий *S.aureus*. Концентрация бактерий в суспензии составляла  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл. Эритроциты крови человека были разведены в приготовленном растворе бактерий в соотношении 1:20, давая конечную концентрацию эритроцитов крови человека в суспензии  $2 \times 10^8$  клеток/мл.

### Результаты разработки, исследований и их обсуждение

Для проведения исследований был разработан биопроекторный чип-формат на основе ИТО-микроэлектродов, фотография центральной части которого показана на рис. 3. На рис. 3 видно, что предложенная круговая конфигурация ИТО-микроэлектродов содержит центральную часть в виде круга диаметром 100 мкм и состоит из массива микроэлектродов размером 10 мкм и 50 мкм, между которыми ширина зазоров соответственно составляет 10 и 30 мкм. Полный диаметр топологического рисунка чувствительной области чип-формата составляет 6 мм. Толщина ИТО слоя размером 100 нм была получена на стеклянной подложке с помощью высокочастотного (ВЧ) магнетронного распыления в вакууме мишени из сплава  $\text{In}(90\%) - \text{Sn}(10\%)$ . Распыление проходило в газовой смеси аргона  $\text{Ar}$  и кислорода  $\text{O}_2$  (соотношение 90:10 об. %). Режимы получения пленки: давление  $2 \times 5 \cdot 10^{-1}$  Па, температура подложки  $150^\circ\text{C}$ , мощность ВЧ магнетронного разряда 300 Вт, время нанесения пленки – 5 мин.

Измеренные характеристики ИТО микроэлектродов: удельное сопротивление  $150 \pm 25$  Ом·см, оптическое пропускание в видимом диапазоне света составляет более 80 %. Перед нанесением ИТО слоя на стеклянную подложку ее предварительно очищали в ультразвуковой ванне с применением слабощелочного раствора, изопропилового спирта и дистиллированной воды с последующей промывкой под струей дистиллированной воды.

Анализ принципов реализации гибридного (комбинированного) электрокинетического механизма разделения и концентрирования клеток в гетерогенной суспензии рассматривается в работе [6], в которой используется чип-формат похожей конфигурации. Однако авторы работы, к сожалению, не указывают материалы микроэлектродов и подложки, а также размеры микроэлектродов и зазоров между ними. Анализ управляемого перемещения клеток проводится ими с позиции анализа диэлектрофоретических, электрофоретических и электрогидродинамических сил, действующих в исследуемой суспензии одновременно с момента подачи на микроэлектроды чип-формата напряжений переменного и постоянного тока. Селективное концентрирование мелких клеток (бактерий) на поверхности центрального электрода и отделение

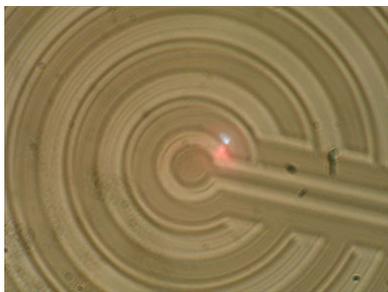


Рис.3- Фотография центральной области топологического рисунка разработанного биопроекторного чип-формата на основе ИТО микроэлектродов

от них более крупных клеток (эритроцитов) предполагает подбор соответствующего электрического режима (амплитуда, частота, величина смещения) на заданной конфигурации микроэлектродов, чтобы электрогидродинамическая и диэлектрофоретическая силы действовали в противоположных направлениях. Этим обеспечивается направление перемещения мелких клеток к центральному электроду и задержание направления к нему крупных клеток.

Все фотоматериалы, которые представлены ниже, были получены при следу-

ющих параметрах электрического режима:  $U_{см} = 0,52$  В;  $U_{пер1} = 4,0$  В (от пика до пика);  $U_{пер2} = 2,0$  В (от пика до пика); оптимальное значение частоты  $f = 800$  Гц. В исследованиях были использованы три чип-формата, на чувствительную область которых, в районе центрального микроэлектрода, наносились микрокапли суспензий объемом 20 мкл, 10 мкл и 5 мкл, взятые из 5 % раствора глюкозы, содержащего  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл и концентрацию эритроцитов крови человека  $2 \times 10^8$  клеток/мл. Время записи видеоматериалов составляло 15 мин для каждого исследуемого чип-формата. На представленных ниже фотоматериалах временной интервал составляет 10 мин.

На рис. 4,а,б,в,г приведены фотоматериалы, демонстрирующие процесс комбинированного воздействия указанного выше электрического режима на клетки суспензии, имеющей объем 20 мкл. На фотографии рис. 4,б видно, что после нанесения микрокапли (рис.4а) происходят довольно интенсивные комбинированные воздействия электрогидродинамических и диэлектрофоретических сил в районе центрального электрода и подводящих контактных дорожек. По мере дальнейшего воздействия данных сил, как видно на рис. 4,в, происходит постепенное удаление с поверхности центрального электрода и его контактной дорожки эритроцитов. К 10 минуте площадь очищения от эритроцитов центрального электрода и его контактной дорожки (рис. 4,г) значительно увеличивается. На поверхности центрального электрода (рис. 4,г) наблюдаются места в виде темных пятен, которые, скорее всего, представляют скопления бактерий *S.aureus*, сконцентрированные на шероховатой поверхности пленки ИТО.

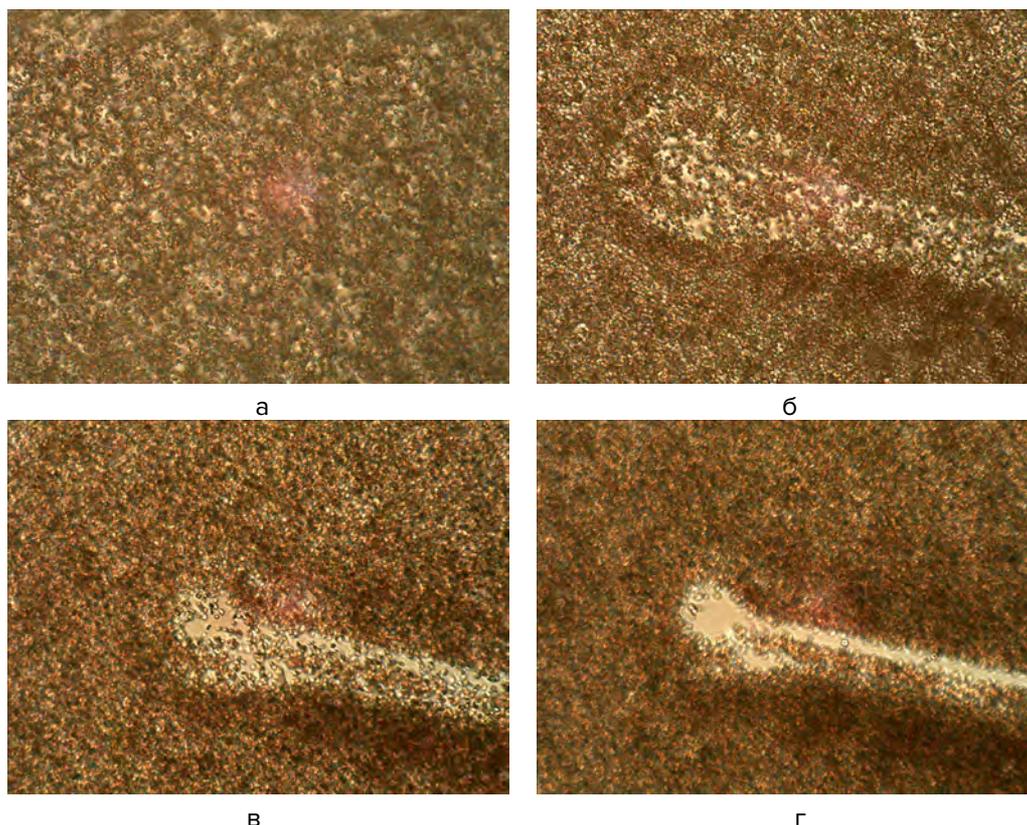


Рис. 4. Фотоматериалы процесса разделения и концентрирования клеток в микрокапле объемом 20 мкл

На рис. 5,а видно, что при нанесении в область центрального электрода микрокапли объемом 10 мкл происходят аналогичные, но более быстрые процессы удаления с поверхности центрального электрода эритроцитов (рис. 5,б,в). А к 10 минуте поверхность центрального электрода и подводящая к нему контактная дорожка полностью очищаются

от эритроцитов (рис. 5,г), что связано, скорее всего, со значительно меньшей плотностью нанесенных клеток. На рис. 5,г в области центрального электрода также наблюдаются места в виде темных пятен, которые также могут являться скоплениями бактерий *S.aureus*.

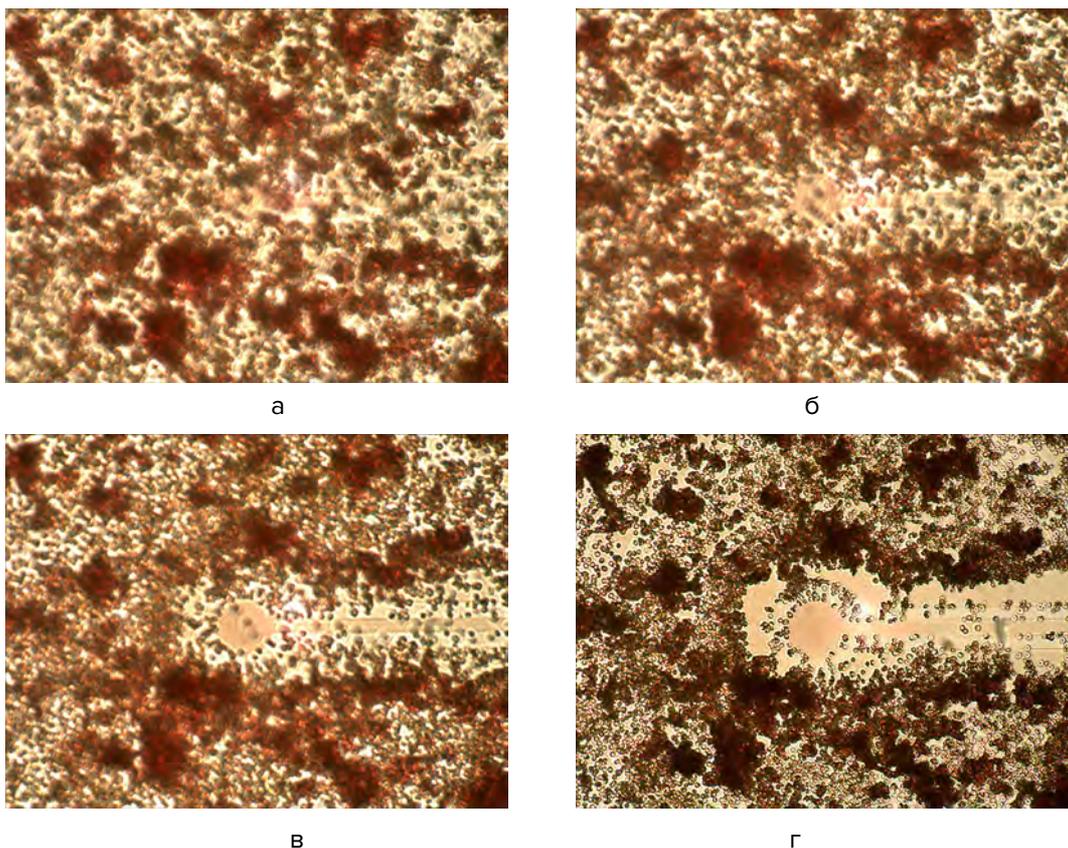


Рис. 5. Фотоматериалы процесса разделения и концентрирования клеток в микрокапле объемом 10 мкл

Для того чтобы убедиться в этом, нами в процессе проведения измерений с микрокаплями объемом в 10 мкл был на короткое время заменен объектив с 6X на 20X. Полученные при этом видеоматериалы были конвертированы в фотоматериалы. Фрагмент фотоматериалов в области центрального электрода приведен на рис. 6.

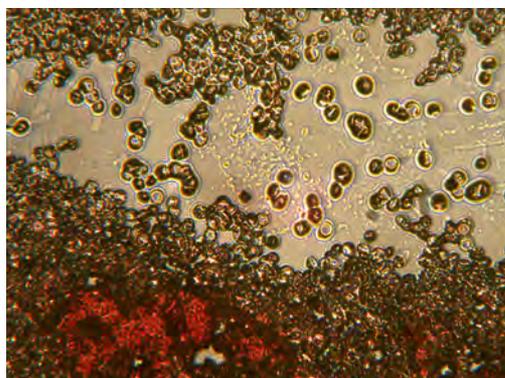


Рис. 6. Фрагмент фотоматериалов процесса разделения и концентрирования клеток в микрокапле объемом 10 мкл при увеличении в 20X.

На рис. 6 видно, что бактерии *S.aureus* скапливаются, в основном, в области центрального электрода и частично на подводящих контактных дорожках, в районах, где эритроциты удалены с помощью отрицательной диэлектрофоретической силы.

При нанесении микрокапли объемом 5 мкл (рис. 7,а) действие диэлектрофоретических сил, как видно на рис. 7,б, происходит с момента подачи на электроды электрического режима. Очищение центрального электрода и контактных дорожек от эритроцитов происходит значительно быстрее, чем в предыдущем

случае. Однако на поверхности центрального микроэлектрода, вверху, виден кластер эритроцитов (рис. 7,в), который к 10 минуте практически разрушается за счет действия выталкивающей диэлектрофоретической силы (рис. 7,г).

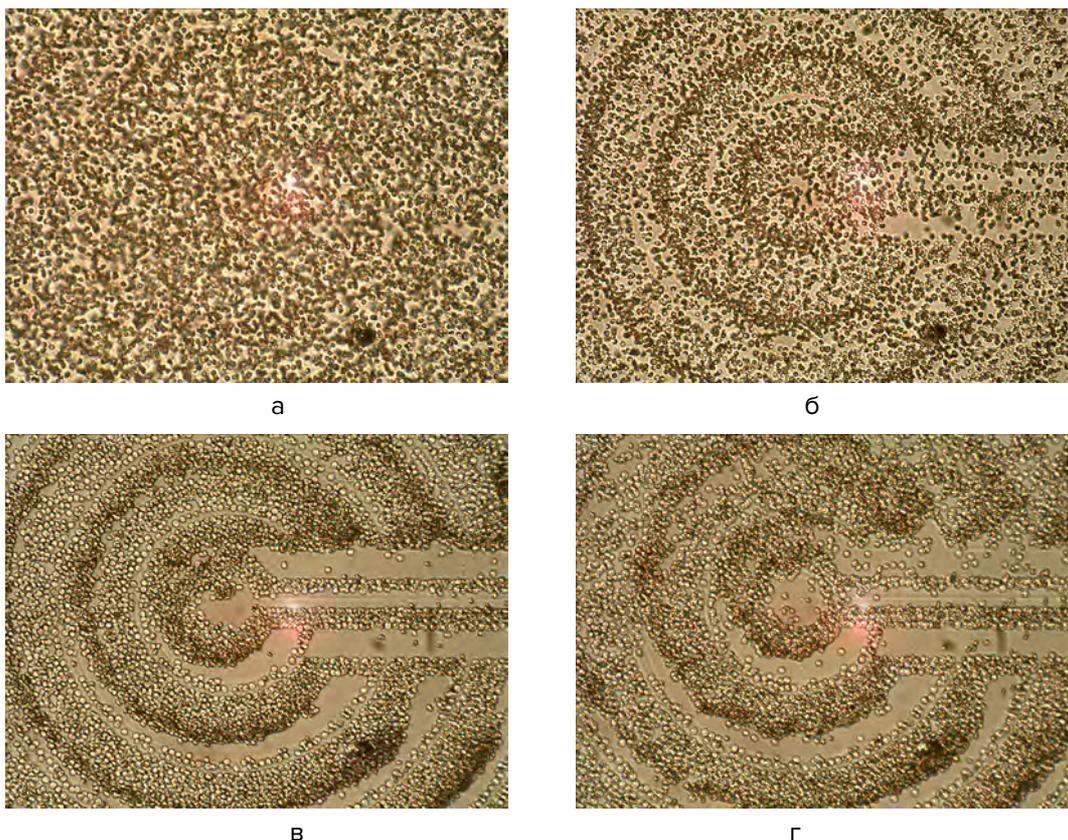


Рис. 7. Фотоматериалы процесса разделения и концентрирования клеток в микрокапле объемом 5 мкл

Таким образом, на примере смешанных суспензий бактерий *S.aureus* и эритроцитов крови человека показано, что вне зависимости от количества клеток в смешанной суспензии все три исследуемых биопроцессорных чип-формата на основе ИТО микроэлектродов, демонстрируют одни и те же механизмы происходящих электрокинетических биопроцессов, связанных с разделением и концентрированием клеток различного размера.

Полученный результат хорошо согласуется с результатами работы [6], из которой следует, что при соответствующем электрическом режиме и частоте 800 Гц клетки крови испытывают отрицательную диэлектрофоретическую силу, которая выталкивает их с поверхности центрального электрода, поскольку она сильнее электрогидродинамической силы, ответственной за перетаскивание клеток за счет электроосмотического потока на переменном напряжении.

В то же время бактерии транспортируются в район центрального электрода за счет электроосмотического потока, поскольку электрогидродинамическая сила для бактерий больше их положительной диэлектрофоретической силы. Выталкивающая клетки крови диэлектрофоретическая сила подтягивает бактерии к середине центрального электрода, где электрогидродинамическая сила является самой слабой, а диэлектрофоретическая и электрофоретическая силы являются самыми большими.

### Заключение

Полученные результаты исследований показывают, что разработанный биопроцессорный чип-формат на основе ИТО микроэлектродов может найти широкое при-

менение в методах идентификации бактерий по типу «отпечатков пальцев», используя для этого регистрацию характеристик пиков рамановского спектра в области концентрирования бактерий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амосова, Л.П. Магнетронное напыление прозрачных электродов ITO из металлической мишени на холодную подложку / Л.П. Амосова, М.В. Исаев // Журнал технической физики. – 2014.– Том 84, вып. 10. – С. 127–132.
- 2.Троян, П.Е. Прозрачные электропроводящие покрытия с контролируемыми значениями коэффициента пропускания и поверхностного сопротивления / П.Е. Троян, Ю.В. Сахаров, Ю.С. Жидик // Доклады Томского государственного университета систем управления и радиоэлектроники. – 2014. – N2 1(31). – С. 99–101.
3. Планарные чип-форматы с Ni микроэлектродами для изучения манипуляций клетками в условиях гибридной электрокинетике / Т.И. Ореховская [и др.] // Современные методы и технологии создания и обработки материалов : сб. научных трудов. В 3 кн. Кн. 1. Материаловедение / редкол.: А. В. Белый (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ФТИ НАН Беларуси, 2018. – С. 150–58.
4. Евстратов, А.А. Физические методы управления движением и разделением микрочастиц в жидких средах. I. Диэлектрофорез, фотофорез, оптофорез, оптический пинцет / А.А. Евстратов // Научное приборостроение. – 2005. – Том15, №1. – С. 3–20.
5. Экспериментальная установка для электрокинетического управления разделением и концентрированием клеток на поверхности планарной конструкции микрочипа из микрокапли суспензий / В.А. Лобан [и др.] // Современные методы и технологии создания и обработки материалов : сб. научных трудов. В 3 кн. Кн. 2. Технологии и оборудование механической и физико-технической обработки/ редкол.: А. В. Белый (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ФТИ НАН Беларуси, 2017. – С. 229–237.
6. I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang et al. Rapid (<5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // Scientific Reports. 2013. 3:2365. DOI:10.1038/strep02365.

#### REFERENCES

1. Amosova L.P., Isayev M.V. Magnetronnoye napyleniye prozrachnykh elektrodov ITO iz metallicheskoj misheni na kholodnuyu podlozhku[Magnetron sputtering of transparent ITO electrodes from a metal target onto a cold substrate]// Zhurnal tekhnicheskoy fiziki,2014,tom 84,vyp. 10,S.127-132. (in Russ.)
2. Troyan P.Ye., Sakharov YU.V., Zhidik YU.S. Prozrachnyye elektroprovodyashchiye pokrytiya s kontroliruyemyimi znacheniyami koeffitsiyenta propuskaniya i poverkhnostnoye soprotivleniya[Transparent electrically conductive coatings with controlled values of transmittance and surface resistance]//Doklady Tomskogo gosudarstvennogo universiteta sistem upravleniya i radioelektroniki.2014.N2 1(31),S99-101.
3. T. I. Orekhovskaya, A. I. Drapeza, S.K. Lazaruk, V. A. Loban,A.I. Khmel' nitskiy, V.A.Sysov, G.A. Skorokhod , Ye. I. Gudkova Planarnyye chip-formaty s Ni mikroelektrodami dlya izucheniya manipulyatsiy kletkami v usloviyakh gibridnoy elektrokinetiki[Planar chip formats with Ni microelectrodes for studying cell manipulations under conditions of hybrid electrokinetics] // Sovremennyye metody i tekhnologii sozdaniya i obrabotki materialov :sb. nauchnykh trudov. V 3 kn. Kn. 1. Materialovedeniye/ redkol.: A. V. Belyy (gl. red.) [i dr.]. — Minsk: FTI NAN Belarusi, 2018. — S. 150-158.
4. A.A.Yevstratov Fizicheskiye metody upravleniya dvizheniyem i razdeleniyem mikrochastits v zhidkikh sredakh.I. Dielektroforez, fotoforez, optoforez, opticheskiy pintset [Physical methods of microparticle transport and separation control in liquid media. I. Dielectrophoresis, photophoresis, optophoresis, optical tweezers] // Nauchnoye priborostroyeniye[Scientific Instrumentation], 2005, V.15, iss.1, pp.3-20. (in Russ.)
5. V. A. Loban, A. I. Drapeza, T. I. Orekhovskaya, et al. Eksperimental'naya ustanovka dlya elektrokineticheskogo upravleniya razdeleniyem i kontsentrirvaniyem kletok na poverkhnosti planarnoy konstruksii mikrochipa iz mikrokapli suspenziy[Experimental setup for electrokinetic control of cell division and concentration on the surface of a planar microchip design from a microdroplet of suspensions]// Sovremennyye metody i tekhnologii sozdaniya i obrabotki materialov :Sb. nauchnykh trudov. V 3 kn. Kn. 2. Tekhnologii i oborudovaniye mekhanicheskoy i fiziko-tekhnicheskoy obrabotki/ redkol.: A. V. Belyy (gl. red.) [i dr.]. — Minsk: FTI NAN Belarusi, 2017. — pp. 229–237. (in Russ.)
6. I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang et al. Rapid (<5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // Scientific Reports, 2013, 3:2365. DOI:10.1038/strep02365

Статья поступила в редакцию 29.04.2019