

УДК 621.317.329+539.196:537

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СРЕДЫ И РАЗМЕРОВ КОНСТРУКЦИОННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БИОПРОЦЕССОРНОГО ЧИП-ФОРМАТА С Ni МИКРОЭЛЕКТРОДАМИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ *S.AUREUS* В МОДЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ И В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

¹А. И. ДРАПЕЗА, ²С.К.ЛАЗАРУК, ³Е. И. ГУДКОВА, ¹В. А. ЛОБАН, ²Т. И. ОРЕХОВСКАЯ,
¹А.И. ХМЕЛЬНИЦКИЙ, ³Г. А. СКОРОХОД

¹Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, г. Минск, Беларусь

³Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь

С использованием видео- и фотоматериалов продемонстрирован точный и воспроизводимый режим электрокинетической сепарации эритроцитов от бактерий *S.aureus* и концентрирования *S.aureus* в модельных условиях и в цельной крови без антикоагулянта и с антикоагулянтом на основе биопроцессорного чип-формата с Ni микроэлектродами, требующий подбора соответствующих амплитудно-частотных параметров электрического режима на топологической конфигурации микроэлектродов и составе дисперсной фазы, обеспечивающего противоположное действие составляющих электрогидродинамических и диэлектрофоретических сил. В условиях этого режима эритроциты крови будут выталкиваться с поверхности центрального электрода большой по величине отрицательной диэлектрофоретической силой. Электроосмотический поток, обусловленный перемещением эритроцитов, будет частично подтягивать бактерии к середине центрального электрода. В то же время электроосмотический поток на переменном токе, вызванный электрогидродинамической силой для бактерий, которая значительно превышает положительную диэлектрофоретическую силу для эритроцитов, будет обуславливать основной транспорт бактерий в район центрального электрода и токоподводящей дорожки к нему. Показано, что при соотношении разведения цельной крови с антикоагулянтом 1:25, количество бактерий и их коагулятов, сконцентрированных на поверхности круглого электрода после сепарации во много раз больше, чем при разведении 1:50. Показано, что на токоподводящей к центральному электроду дорожке *S.aureus* имеют цепочечную структуру, размещенную в середине дорожки.

Ключевые слова: биопроцессорный чип-формат, Ni микроэлектроды, цельная кровь человека, эритроциты, бактерии *S.aureus*, сепарация, концентрирование, электрокинетический транспорт

OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION AND SIZES OF DESIGN ELEMENTS OF BIOPROCESSOR CHIP FORMAT WITH Ni MICROELECTRODES FOR SEPARATION AND CONCENTRATION OF *S.aureus* UNDER MODEL CONDITIONS AND IN WHOLE BLOOD

¹A. I. DRAPEZA, ²C. K. LAZARUK, ³E. I. GUDKOVA, ¹V. A. LOBAN, ²T. I. OREKHOVSKAYA,
¹A. I. KHMELNITSKY, ³G. A. SKOROKHOD,

¹Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Using video and photographic materials, an accurate and reproducible mode of electrokinetic separation of erythrocytes from *S. aureus* bacteria and concentration of *S. aureus* under model conditions and in whole blood without an anticoagulant and with an anticoagulant based on a bioprocessor chip format with Ni microelectrodes was demonstrated, requiring the selection of the appropriate amplitude-frequency parameters of the electric mode on the topological configuration of the microelectrodes and the composition of the dispersed phase, providing the opposite action of the components of the electrohydrodynamic and dielectrophoretic forces. Under the conditions of this regime, red blood cells will be pushed out from the surface of the central electrode by a large negative dielectrophoretic force. The electroosmotic flow caused by the movement of red blood cells will partially pull bacteria to the middle of the central electrode. At the same time, the AC electroosmotic flow, caused by the electrohydrodynamic force for bacteria, which significantly exceeds the positive dielectrophoretic force for erythrocytes, will determine the main transport of bacteria to the region of the central electrode and the current-carrying path to it. It was shown that when the ratio of dilution of whole blood with anticoagulant is 1:25, the number of bacteria and their coagulates, concentrated on the surface of the round electrode after separation, is many times greater than at dilution of 1:50. It was shown that *S. aureus* has a chain structure located in the middle of the track on the path leading to the central electrode.

Keywords: bioprocessor chip format, Ni microelectrodes, human whole blood, erythrocytes, *S. aureus* bacteria, separation, concentration, electrokinetic transport.

Введение

Разработка информационных микробиологических технологий обнаружения и дифференциации вида инфекционных агентов, обладающих низкой себестоимостью, высокими показателями быстродействия и эффективности при диагностике и лечении бактериемии и сепсиса «у кровати больного» является одной из актуальных проблем современной медицины.

Для решения такого рода задач используются современные зарубежные информационные системы, такие как биохимический микробиологический анализатор VITEK 2 и масс-спектрометр VITEK MS. Эти системы допускают таксономическую классификацию и систематизацию инфекционных агентов по биохимическим показателям (VITEK 2) и по массе белковых молекул, входящих в состав клеток инфекционного агента (VITEK MS). Однако, из-за громоздкости и очень высокой стоимости самих систем и расходных материалов к ним, такими системами, как правило, оснащаются научно-исследовательские лаборатории, входящие в состав республиканских клинических центров (<https://www.biomerieux.com/>).

В то же время, в мире интенсивно развивается перспективное направление научного приборостроения, изначально ориентированного на портативность создаваемого оборудования для медицины. Успехи, которые достигнуты к настоящему времени в областях микро- и нанотехнологий, а также нанобиотехнологий, позволяют создавать биопроекторные чип-форматы [1], с помощью которых, в пределах металлизированной поверхности одного чип-формата, появляется возможность совмещения точных и воспроизводимых манипуляций по сепарации и концентрированию объектов дисперсной фазы, например, бактерий и клеток крови, в небольших объемах жидкой среды, с методами измерения информативных параметров при дифференциации вида инфекционных агентов электрофизическими или оптическими методами [2,3].

Стоимость биопроекторного чип-формата, во-многом, определяется технологической сложностью изготовления его конструкции и применением для изготовления микроэлектродов драгметаллов (золото, платина). С целью снижения его стоимости, нами в работе [3], была изучена возможность манипуляции бактериями *S.aureus* с помощью микроэлектродов на основе Ni. Результаты проведенных исследований показали, что незначительный электрокинетический транспорт присутствует только для *S.aureus* на частоте 300 Гц. При определенных параметрах электрического режима управления электрокинетическим транспортом клеток показано наличие различного типа электролиза Ni микроэлектродов в изотоническом растворе глюкозы, содержащем *S.aureus*. Анализ полученных результатов показал [3], что наблюдаемые виды коррозии, «пятнами» и от длительности квазичастотного воздействия, могут быть обусловлены влиянием состава электролита и его температуры на состояние металлизированной поверхности никелевых тонкопленочных микроэлектродов, имеющих незначительную толщину, в пределах 60 нм [4].

Целью настоящей работы является оптимизация состава среды и размеров конструктивных элементов биопроекторного чип-формата с Ni микроэлектродами для сепарации и концентрирования *S.aureus* в модельных условиях и в цельной крови.

Материалы и методы исследований

В работе использованы эритроциты, выделенные из цельной крови человека, цельная кровь без антикоагулянта и с антикоагулянтом ЭДТА (этилендиаминтетраацетат).

Для проведения электрокинетических исследований был приготовлен экспериментальный буферный раствор на основе изотонического буфера PBS (Phosphate Buffered Saline (1X, pH=7.4)), электрическая проводимость которого была доведена до значения 1,009 мСм/см с помощью изотонического раствора глюкозы (~5%), в связи с тем, что клетки крови являются высокочувствительными к осмотическому давлению раствора. Доведение электрической проводимости экспериментального буферного раствора до указанного выше значения осуществлялось с помощью профессионального портативного тестера ЕС, рН и Т (Китай), измеряющего рН в диапазоне от 0,00 до 14,00 (безразмер-

ные единицы, точность $\pm 0,01$ pH), электрическую проводимость ЕС в диапазоне от 0,00 до 19990 (единицы измерения в мкСм/см, точность ± 10 мкСм/см) и температуру T °С в диапазоне от 0,1°С до 60 °С (точность $\pm 0,5$ °С).

В экспериментальном буферном растворе количество бактерий *S.aureus* и эритроцитов крови обеспечивалось приблизительно на уровне значений $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл и $1 \cdot 10^7$ клеток/мл соответственно, путем соответствующих разведений.

Фотошаблоны для изготовления трехэлектродного биопроцессорного чип-формата оставались теми же, что и в работе [3]. Тонкие пленки никеля на стеклянной подложке, имеющие толщину приблизительно 0.4 мкм, создавали с помощью вакуумной электронно-лучевой установки типа Орион (БГУИР).

Для проведения исследований использовалась экспериментальная установка, функциональные возможности и технические характеристики которой приведены в работе [5]. Калибровка оптической системы установки проводилась с использованием объективов 6,3X и 20X и микрометрического слайда ОМП (ГОСТ 7513-55 № 612781), имеющего минимальное деление калибровочной шкалы 0,01мм, и программного обеспечения к используемой в экспериментальной установке видеокамере DSM-510 (Китай).

Параметры электрических режимов задавались с помощью функционального генератора (ФГ), входящего в состав экспериментальной установки [5]. Два отдельных генератора переменного напряжения $U_{пер1}$ и $U_{пер2}$, запускающиеся одновременно с нулевой фазы, подключались к крайним контактам чип-формата. Генератор для задания постоянного напряжения смещения подключался к центральному контакту используемого кругового чип-формата, как показано на рис.1.

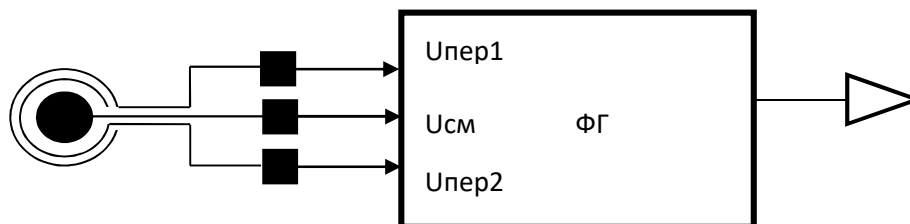


Рис.1- Обобщенная структурная схема подключения трехэлектродного чип-формата

Методика работы с экспериментальной установкой состоит в получении видеоматериалов, характеризующих электрокинетический транспорт различных типов клеток в области металлизации топологического рисунка микроэлектродов биопроцессорного чип-формата. Для последующего анализа проводят конвертирование полученных видеоматериалов в формат «.jpeg» с помощью редактора Free Video to JPG Converter. Запись видеоматериалов в измерительной ячейке с помощью видеокамеры DSM-510 и объектива 20X осуществлялась в иммерсионном режиме работы объектива.

Результаты и их обсуждение

Модельные условия На рис.2 приведены результаты исследований электрокинетического процесса сепарации бактерий *S.aureus* от эритроцитов, выделенных из цельной крови человека, не содержащей антикоагулянта ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), и разведенных в соотношении 1:50 с помощью 5% раствора глюкозы, а также процесса концентрирования *S.aureus*, используя следующие параметры электрического режима: $U_1=4$ В (от пика до пика), $U_2=2$ В (от пика до пика), $U_{см}=0,554$ В, $F=801,4$ Гц. Поскольку Ni микроэлектроды непрозрачны, то видеоматериалы были получены в отраженном свете. На рис.2 Ni микроэлектроды имеют светлый тон, а зазоры между ними – темный. Состав среды для электрокинетических исследований, состоящей из суспензии эритроцитов крови без антикоагулянта, экспериментального буферного раствора PSB и суспензии бактерий *S.aureus*, в объемном соотношении находился 1:4:4 соответственно.

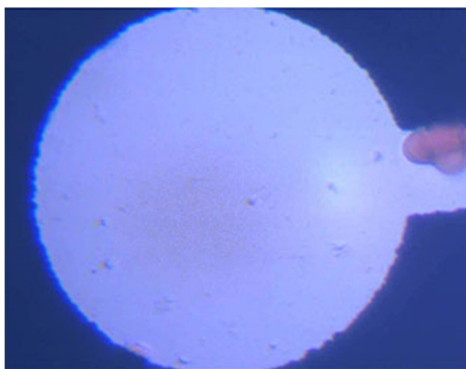


Рис.2 – Фотоматериалы результатов сепарации *S.aureus* от эритроцитов цельной крови без антикоагулянта и электрокинетического концентрирования *S.aureus* на поверхности центрального микроэлектрода

Измерительная ячейка заполнялась 15 мкл среды указанного состава. Запись электрокинетического процесса сепарации и концентрирования *S.aureus* проводилась в течение заданного периода времени, равного 15 минутам. Из анализа полученных фотоматериалов, на рис.2 не показанных, следует, что эритроциты выталкиваются с площади центрального электрода и площади его контактной дорожки, гораздо быстрее, практически в течение 5 минут. На рис.2 видно, что меньшие по размерам клетки, предположительно *S.aureus*, сосредотачиваются по всей поверхности микроэлектрода в центре и частично на токопроводящей к нему дорожке, что не показано. Программно-аппаратный анализ размеров клеток показывает, что средний размер эритроцитов составляет $\sim 5,7$ мкм, а для более мелких клеток и их коагулятов, лежащих в области круга и на токоподводящей к нему дорожке, средний размер находится в диапазоне от $\sim 0,5$ мкм до ~ 3 мкм.

Цельная кровь с антикоагулянтом Параметры амплитудно-частотного управления перемещением клеток те же, что и в предыдущем случае. Объемное соотношение состава среды составляет 1:10:10. Цельная кровь с антикоагулянтом разводилась в изотоническом растворе глюкозы в соотношении 1:50. Запись видеоматериалов проводилась при совместном воздействии отраженного и проходящего света. Фотоматериалы процесса сепарации бактерий

S.aureus от клеток цельной крови с антикоагулянтом, в основном эритроцитов, и концентрирования *S.aureus* с помощью биопроцессорного чип-формата по истечении 630 секунд показаны на рис.3 а,б.

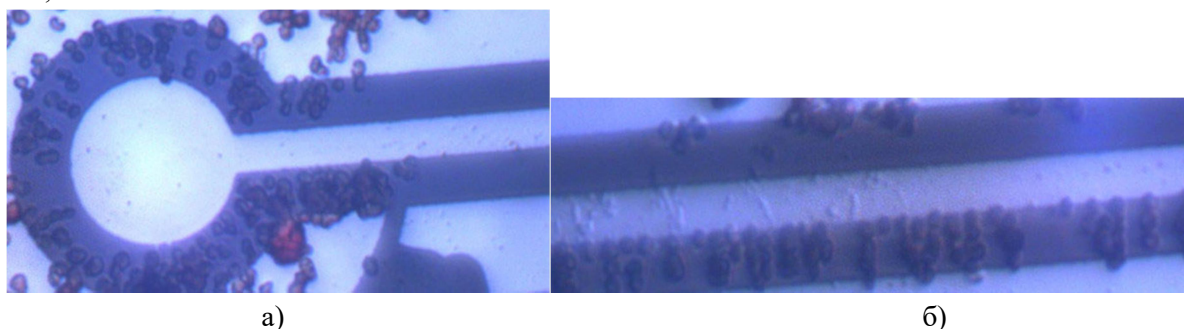


Рис.3 – Фотоматериалы сепарации бактерий *S.aureus* от эритроцитов цельной крови с антикоагулянтом и электрокинетического концентрирования *S.aureus* биопроцессорным чип-форматом
(а) – центральный микроэлектрод с прилегающим участком токоподводящей дорожки; (б) – фрагмент последующего участка поверхности токоподводящей дорожки для (а)

Из приведенных на рис.3а,б фотоматериалов хорошо видно, что эритроциты цельной крови с антикоагулянтом полностью выталкиваются из площади круга центрального микроэлектрода и токоподводящей к нему дорожки при параметрах электрического режима $U_1=6В$ (от пика до пика), $U_2=2В$ (от пика до пика), $U_{см}=0,554 В$, $F=801,4Гц$. На очищенной от эритроцитов и других клеток цельной крови поверхности Ni микроэлектродов наблюдается наличие значительного количества более мел-

ких клеток и их коагулятов, имеющих диапазон среднего размера указанный выше. Однако на рис.3б видны более крупные коагуляты, средний размер которых по ширине составляет $\sim 2,5$ мкм, а также их цепочечные образования в поперечном направлении к дорожке, в длину достигающие более 10 мкм, что, в общем-то, характерно для бактерий *S.aureus*.

При параметрах электрического режима $U_1=6\text{В}$ (от пика до пика), $U_2=2\text{В}$ (от пика до пика), $U_{\text{см}}=0,554\text{ В}$, $F=801,4\text{ Гц}$ и объемном соотношении состава среды 1:10:10 было изучено влияние разведения цельной крови с антикоагулянтом изотоническим раствором глюкозы в соотношении 1:25 на процесс сепарации *S.aureus* от эритроцитов и электрокинетического концентрирования *S.aureus* биопроцессорным чип-форматом с Ni микроэлектродами. Фотоматериалы этого процесса представлены на рис.4а,б. Запись видеоматериалов проводилась в течение 15 минут при объеме пробы 15 мкл.

Из приведенных на рис.4 фотоматериалов следует, что сепарация эритроцитов от бактерий *S.aureus* и концентрирование *S.aureus* происходит точно и воспроизводимо для чип-форматов, имеющих одни и те же электрофизические параметры емкости и проводимости (данные не приводятся), измеренные на частотах 100 Гц, 1кГц; 10 кГц и 1МГц с помощью приборов Е7-14 (0,1-10 кГц) и Е7-12 (1МГц) и одном и том же соотношении состава среды 1:10:10. Как видно из рис.4а, при соотношении разведения 1:25, т.е. более высокой плотности цельной крови, количество бактерий и их коагулятов, сконцентрированных на поверхности круглого электрода после сепарации во много раз больше, чем при разведении 1:50.

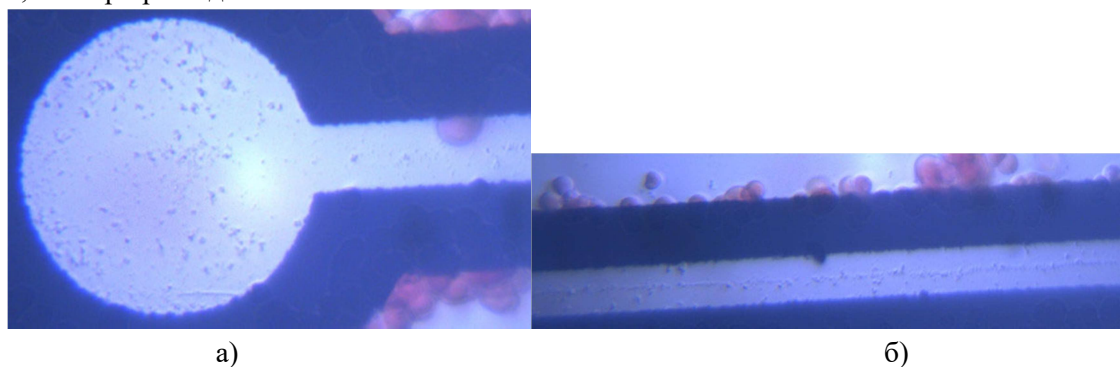


Рис.4 – Фотоматериалы сепарации бактерий *S.aureus* от эритроцитов цельной крови с антикоагулянтом и электрокинетического концентрирования *S.aureus* биопроцессорным чип-форматом (а) – центральный микроэлектрод с прилегающим участком токоподводящей дорожки; (б) – фрагмент последующего участка поверхности токоподводящей дорожки для (а)

Из рис.4а и рис.4б видно также, что бактерии *S.aureus* вдоль токопроводящей располагаются практически по центру, образуя на некоторых участках токопроводящей дорожки сплошные цепочки, длина которых составляет более 20 мкм. Как показывают результаты измерений, средние размеры бактерий и их коагулятов (рис.4а,б) лежат в указанном выше диапазоне $\sim(0,5-3)$ мкм.

Кроме того, полученные результаты исследований показывают, что сепарация эритроцитов от бактерий *S.aureus* и концентрирование *S.aureus* в модельных условиях и в цельной крови с помощью биопроцессорных чип-форматов с Ni микроэлектродами происходит точно и воспроизводимо только для чип-форматов, имеющих одинаковые параметры емкости и проводимости, измеренные на частотах 100 Гц, 1кГц; 10 кГц и 1МГц.

Показано также, что подбор соответствующих амплитудно-частотных параметров электрического режима на топологической конфигурации микроэлектродов и составе дисперсной фазы, должен происходить до тех пор, пока составляющие электрогидродинамических и диэлектрофоретических сил не будут действовать в противоположных направлениях [1,2]. В условиях этого режима эритроциты крови будут выталкиваться с поверхности центрального электрода большой по величине отрицательной диэлектрофоретической силой. Электроосмотический поток, обусловленный перемещением эритроцитов, будет частично подтягивать бактерии к середине центрального электрода. В то же время электроосмотический поток на переменном токе, вызванный электрогидродинамической си-

лой для бактерий, которая значительно превышает положительную диэлектрофоретическую силу для эритроцитов, будет обуславливать основной транспорт бактерий в район центрального электрода и токоподводящей дорожки к нему.

Таким образом, с использованием видео- и фотоматериалов продемонстрирован точный и воспроизводимый режим электрокинетической сепарации эритроцитов от бактерий *S.aureus* и концентрирования *S.aureus* в модельных условиях и в цельной крови без антикоагулянта и с антикоагулянтом.

Показано, что при соотношении разведения цельной крови с антикоагулянтом 1:25, количество бактерий и их коагулятов, сконцентрированных на поверхности круглого электрода после сепарации во много раз больше, чем при разведении 1:50. Показано, что на токоподводящей к центральному электроду дорожке *S.aureus* имеет цепочечную структуру, размещенную в середине дорожки.

Заключение

Результаты проведенных исследований показывают, что в основе информационных микробиологических технологий обнаружения и дифференциации вида инфекционных агентов, обладающих низкой себестоимостью, высокими показателями быстродействия и эффективности при диагностике и лечении бактериемии и сепсиса «у кровати больного» могут быть использованы и биопроцессорные чип-форматы на основе Ni микроэлектродов. Данный чип-формат может найти широкое применение в методах идентификации бактерий по типу «отпечатков пальцев», используя для этого регистрацию характеристик пиков рамановского спектра в области концентрирования бактерий.

Список литературы

1. 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

2. Ореховская Т.И., Гудкова Е.И., Драпеза А.И., Лазарук С.К., Лобан В.А., Перко С.Л., Скороход Г.А., Хмельницкий А.И. Разработка и исследование биопроцессорного чип-формата на основе ИТО микроэлектродов для манипуляций разделением и концентрированием клеток в гетерогенных суспензиях//Современные методы и технологии создания и обработки материалов: Сб. научных трудов / редколлегия: В. Г. Залесский (гл. ред.) [и др.]. — Минск : ФТИ НАН Беларуси, 2019. — 350 с. : ил.—С.67-74 ISBN 978-985-6441-60-1

3.Т.И. Ореховская, А. И. Драпеза, С.К. Лазарук, В. А. Лобан,А.И. Хмельницкий, В.А.Сысов, Г.А. Скороход, Е. И. Гудкова Планарные чип-форматы с Ni микроэлектродами для изучения манипуляций клетками в условиях гибридной электрокинетики // 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. 150-158.

4. Гурский Л.И., Зеленин В.А. Структура и кинетика взаимодействия металла с окисляющими средами. Минск: Наука и техника. 1982,- 192 с

5. В. А. Лобан, А. И. Драпеза, Т. И. Ореховская, А. И. Хмельницкий, Д. А. Руденко, Г. А. Скороход, Е. И. Гудкова Экспериментальная установка для электрокинетического управления разделением и концентрированием клеток на поверхности планарной конструкции микрочипа из микрокапли суспензий // 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.

REFERENCES

1. 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

2. Orekhovskaya T.I., Gudkova E.I., Drapeza A.I., Lazaruk S.K., Loban V.A., Perko S.L., Skorokhod G.A., Khmelnskiy A.I. Razrabotka i issledovaniye bioprotsessornogo chip-formata na osnove ITO mikroelektrodov dlya manipulyatsiy razdeleniyem i kontsentrirvaniyem kletok v geterogennykh suspenziyakh[Development and research of a bioprocessor chip format based on ITO microelectrodes for manipulating the separation and concentration of cells in heterogeneous suspensions] Sovremennyye metody i tekhnologii sozdaniya i obrabotki materialov: Sb. nauchnykh tru-

dov / redkollegiya: V. G. Zalesskiy (gl. red.) [i dr.]. —Minsk : FTI NAN Belarusi, 2019. — 350 s. : il.—S.67-74 ISBN 978-985-6441-60-1(in Russ.)

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 manipulation in 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. (in Russ.)

4. Gurskiy L.I., Zelenin V.A. Struktura i kinetika vzaimodeystviya metalla s okislyayushchimi sredami[Structure and kinetics of metal interaction with oxidizing media]. Minsk: Nauka i tekhnika. 1982,- 192 s. (in Russ.)

5. V. A. Loban, A. I. Drapeza, T. I. Orekhovskaya, et al. Eksperimental'naya ustanovka dlya elektrokineticheskogo upravleniya razdeleniyem i kontsentrirovaniyem 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.).