بیست و هشتمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و چهاردهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه شهید چمران اهواز،
خوزستان، ایران.
۱۴-۱۲ بهمن ۱۴۰۰

طراحی و ساخت سیستم ثبت الکتروفیزیولوژی مبتنی بر اپتو الکترود آرایه‌ای برای کاربردهای اپتوژنتیک برون‌تنی

پوریا قاسمی[۱]، محمد اسماعیل زیبائی*[۱]، سیده مهشاد حسینی[۱]، محمد رضا صالحی مقدم[۱]

[۱]پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی تهران

* m_zibaye@sbu.ac.ir

چکیده- در تکنیک اپتوژنتیک که به مطالعه و بررسی سیستم عصبی به کمک نور می‌پردازد، لازم است همزمان و یا بعد از تحریکات نوری با استفاده از روش‌های ثبت الکتروفیزیولوژی، عملکرد سلول مورد بررسی قرار گیرد. در این مقاله یک سیستم آرایه ای یکپارچه برای تحریک نوری و ثبت الکتروفیزیولوژی هم‌زمان برای کاربردهای اپتوژنتیک طراحی و ساخته شده است. در این سیستم، آرایه میکروالکترودی ۴×۴ با الکترودهای دایره‌ای به شعاع ۱۵۰ میکرومتر از جنس طلا با امپدانس الکترودهای ۱۰۴ KΩ در فرکانس ۱ kHz ساخته شده است. برای تابش دهی از LEDهای با ابعاد ۱×۰,۵×۰,۳۵ میلی‌متر، طول موج ۴۷۳ نانومتر و حداکثر توان تابشی ۶۰ میلی وات استفاده شده است. عملکرد سیستم طراحی شده نیز با اندازه گیری سیگنال عصبی pc۱۲ و سلول‌های بنیادی قلبی، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

کلید واژه- آرایه میکروالکترودی،آرایه LED، اپتوژنتیک، الکتروفیزیولوژی، اپتورود

Design And Fabrication Of Electrophysiology Recording System Based On Optoelectrode Array For In Vitro Optogenetics Applications.

Pouria Ghasemi[۱], Mohammad Ismail Zibaii[۱*], Seyedeh Mahshad Hosseini[۱], Mohammad Reza Salehi Moghadam[۱]

[۱] Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran

***m_zibaye@sbu.ac.ir**

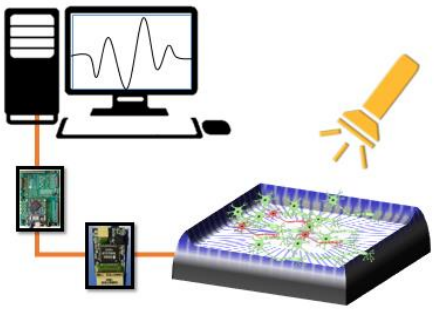
Abstract- In the optogenetic technique, which studies the neural system with light, it is necessary to examine cell function at the same time or after light stimulation using electrophysiological recording methods. In this paper, an integrated array optrode system for optical stimulation and electrophysiology recording is designed and fabricated for optogenetic applications. In this system using micromachining and pholithogeraphy a ٤ × ٤ microelectrode array was fabricated with circular diameter ٣٠٠ µm from and impedance ١٠٤ KΩ at ١ kHz. In this design, LEDs with dimensions of ١ × ٠,٥ × ٠,٣٥ mm, wavelength of ٤٧٣ nm and a maximum radiant power of ٦٠ mW have been used for irradiation. The performance of the designed system has also been evaluated by measuring the pc١٢ nerve signal and cardiac stem cells.

Keywords: Microelectrode Array, LED Array, Optogenetics, Electrophysiology, Optrode

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-19]

مقدمه

اپتوژنتیک یک تکنیک جدید است که به سلول‌های عصبی اجازه می‌دهد به جای جریان الکتریکی توسط نور کنترل شوند. برای این منظور، سلول‌های مورد نظر از نظر ژنتیکی کدگذاری می‌شوند تا پروتئین‌های حساس به نور، مانند کانال‌های چانلرودوپسین و هالورودوپسین را تولید و بیان کنند. با بیان پروتئین‌های حساس به نور، فعالیت عصبی را می‌توان با تابش نور با پارامترهای مشخص تحریک یا مهار کرد. این تکنیک شامل چهار مرحله اصلی است. بخش اول ابزارهای ژنتیکی مورد نیاز در اپتوژنتیک، بخش دوم روش-های انتقال ژن‌های حساس به نور به سلول‌های موردنظر، بخش سوم روش‌های انتقال نور و در بخش چهارم ابزارهای ثبت مانند آپترودها و الکترودها، که در این تحقیق مورد بررسی قرار می‌گیرند. به این ترتیب، اپتوژنتیک کنترل چند وجهی بر عملکرد عصبی و هدف‌گیری ژنتیکی انواع سلول‌های خاص را دارد. همچنین این تکنیک، امکان تحریک با دقت فضایی و زمانی بالا را فراهم می‌کند. برای بررسی تغییرات ایجاد شده توسط تحریکات نوری، لازم است که تکنیک اپتوژنتیک با روش‌های دیگر از جمله تکنیک الکتروفیزیولوژی به عنوان ابزار اصلی ترکیب شود.



شکل۱: نمایی از ترکیب روش اپتوژنتیک با ثبت الکتروفیزیولوژی توسط آرایه اپترودی

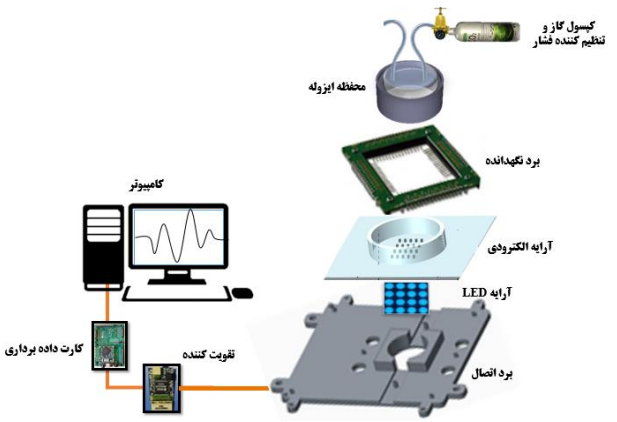
یکی از روش‌های ثبت الکتروفیزیولوژی استفاده از آرایه‌های میکروالکترودی است. یک سیستم آرایه چند الکترودی (MEA)معمولا به عنوان یک ابزار ثبت غیر تهاجمی و برای مطالعه سلول‌ها و بافت‌های تحریک‌پذیر، مانند نورون‌های محیطی و بافت مغز و قلب استفاده می‌شود.

با استفاده از چیدمان شکل(۱)، می‌توان سلول‌های هدف را توسط طول موج‌ها و شدت‌های مختلف مورد تحریک و سپس سیگنال الکتریکی شبکه‌ای از سلول‌های عصبی را ثبت و مورد بررسی قرار داد.

در این مقاله طراحی و ساخت یک سیستم ثبت الکتروفیزیولوژی برون‌تنی مبتنی بر آرایه میکروالکترودی ۴×۴ دوبعدی و زیست‌سازگار به صورت یکپارچه شده با سیستم نوری گزارش می‌شود. به طور کلی این ساختار باعث می‌شود که هزینه‌ها، زمان ساخت و تعداد مراحل کاهش یابند و نیز از پیچیدگی کمتری نسبت به میکروالکترودهای مرسوم برخوردار باشد. برای اینکه بتوان هر سلول را به صورت جداگانه مورد تحریک قرار داد، از تراشه LED که دارای ابعادی متناسب با تراشه آرایه میکروالکترودی است، استفاده شده است.

طراحی و ساخت

سیستم الکتروفیزیولوژی پیشنهادی مطابق شماتیک شکل (۲) شامل دو قسمت ساخت سیستم تابش‌دهی و ساخت آرایه‌های میکروالکترودی می‌باشد. که این دو قسمت به صورت یکپارچه به یکدیگر متصل می‌شوند.

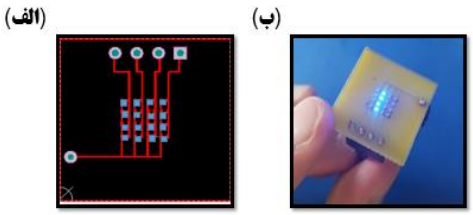


شکل۲: شماتیک کل ساختار

برای تابش دهی در این طراحی یک آرایه LED ۴×۴ سایت تحریک نوری، در طول موج ۴۷۳ نانومتر، بیشینه توان ۶۰ میلی وات، بیشترین جریان ورودی ۲۰ میلی آمپر، ولتاژ ورودی ۵ ولت و ابعاد ۱×۰/۵×۰/۳۵ میلی‌متر ساخته شده است. در این آرایه فاصله مرکز تا مرکز هر دو LED از هم ۸۰۰ میکرومتر می‌باشد. همچنین میزان شدت و فرکانس تابشی توسط هر کدام از LEDها، توسط کد نوشته شده در

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-19]

برنامه لب ویوو و به کمک برد آردوینو قابل کنترل هستند. در شکل(۳) تصویری از آرایه LED ساخته شده نشان داده شده است.

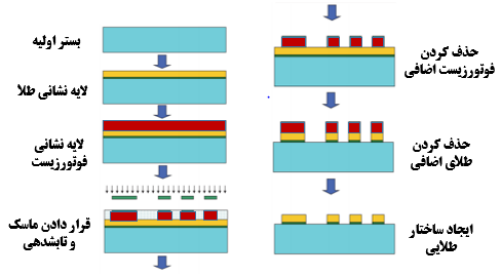


شکل۳: الف)تصویر شماتیک ب) تصویر آرایه LED ساخته شده

ساخت آرایه میکروالکترودی

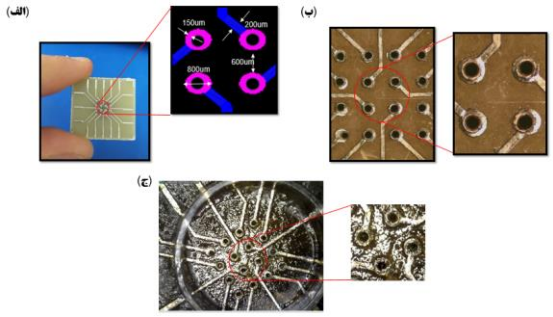
برای ساخت بستر الکترودها، از تکنیک ساخت مدارهای چاپی (PCB) استفاده شده است. در این مرحله الکترودهای تعبیه شده بر روی تراشه با ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر، از جنس قلع هستند و به صورت سایت‌های ثبت دایره‌ای ۴×۴ با شعاع ۴۰۰ میکرومتر در مرکز تراشه قرار گرفته‌اند. فاصله هر دو سایت ثبت از هم در این طرح ۶۰۰ میکرومتر است که به وسیله مسیرهایی به عرض ۲۰۰ میکرومتر به پایانه‌هایی به عرض ۵۰۰ میکرومتر برای اتصال به مدارهای خارجی متصل می‌شوند. برای ایجاد مسیرهای انتقال نور، در مرکز سایت‌ها حفره هایی با شعاع ۲۵۰ میکرومتر توسط دستگاه CNC ایجاد می‌شوند. با ایجاد این حفره‌ها در مرکز هر سایت، عرض هر سایت به ۱۵۰ میکرومتر کاهش پیدا می‌کند.

الکترودها در این طرح به خاطر جنس قلع، دارای امپدانس الکتریکی ۴۳۷ کیلو اهم در فرکانس ۱ کیلوهرتز می‌باشند. برای کاهش امپدانس، لایه نشانی طلا به روش پاششی به ضخامت ۲۰۰ نانومتر صورت گرفته است. در این مرحله تمام سطح تراشه با یک لایه نازک از طلا لایه نشانی می‌شود و برای اینکه طلا تنها بر روی سایت‌های ثبت الکترودی باقی بماند با استفاده از تکنیک لیتوگرافی سایر قسمت‌های تراشه از قبیل سیم‌های اتصال با فوتورزیست پوشش داده می‌شود. تمام مراحل ساخت الکترودها در شکل(۴) نشان داده شده است. برای عایق سازی الکترودها مجددا از روش لیتوگرافی استفاده شده است بگونه‌ای که فقط در این مرحله تمام ساختار با فوتورزیست عایق شده و پدهای الکترودی فاقد روکش فوتورزیست می‌باشد.



شکل۴: مراحل تکنیک لیتوگرافی

پس از اتمام ساخت، تراشه الکترودی به صورت یکپارچه به سیستم تابش‌دهی متصل می‌شود. در شکل (۵) تصویری از الکترودهای ساخته شده نشان داده شده است.



شکل۵: الف) بستر و ابعاد الکترودهای ثبت ب) نمای الکترودها بعد از لایه نشانی ج) نمای الکترودها بعد از لیتوگرافی

چیدمان آزمایش برای ثبت الکتروفیزیولوژی

بعد از آماده سازی تراشه الکترودی و سیستم تابش‌دهی، برای انجام ثبت الکتروفیزیولوژی از چیدمان شکل(۶) استفاده شده است که شامل الکترود آرایه‌ای، برد اتصال الکترود آرایه‌ای، تقویت کننده و کارت داده برداری می‌باشد. ثبت از سلول‌های عصبی pc۱۲ و قلبی بعد از اندازه‌گیری امپدانس الکترودها، صورت گرفته است. برای این منظور طبق استانداردهای کاشت سلول در مدت ۲۴ ساعت سلول-های هدف بر روی الکتوردها کاشته می‌شود تا برای ثبت سیگنال آماده شوند [۱]. بطور مثال در ثبت سیگنال از سلول PC۱۲، ابتدا رده سلولی PC۱۲ در محیط کشت کامل که حاوی DMEM-High glucose بود، همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۰٪ سرم اسبی و ۲ میلی مولار گلوتامین و ۱٪ آنتی بیوتیک- آنتی مایکوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، O_2 ۲۰% و CO_2 ۵% کشت داده شدند. پس از

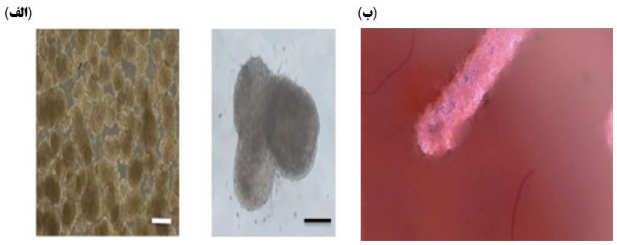
[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-19]

پاساژ، سلول‌ها درون تراشه‌های الکترودی کاشته شدند و توسط اجزا شکل(۶) از آن‌ها ثبت گرفته شد.

شکل۶: اجزا سیستم ثبت الکتروفیزیولوژی

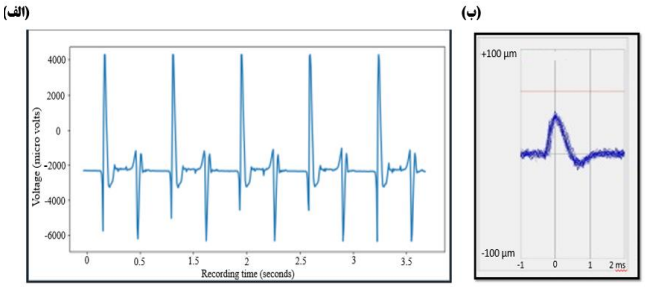
نتایج و جمع‌بندی

در این طراحی مقدار امپدانس الکترودها قبل و بعد از لایه نشانی طلا اندازه‌گیری و مقادیر ۳۴۰، ۲۱۰، ۱۰۳ و ۹۳ کیلواهم به ترتیب در فرکانس‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ هرتز اندازه‌گیری شده است. سپس ثبت الکتروفیزیولوژی از سلول‌های عصبی pc۱۲ و سلول‌های قلبی (hPSC- derived cardiomyocytes) انجام شده است. در شکل (۷) تصویر یک نمونه از سلولهای کشت داده شده بر روی یک الکترود نشان داده شده است. با توجه به اینکه مجموعه سلولی که بر روی هر الکترود قرار گرفته ثبت انجام می‌شود، از دیدگاه الکتروفیزیولوژی سیگنال ثبت شده از نوع ثبت میدانی می‌باشد که در بازه فرکانسی ۱۰۰-۳۰۰ Hz قرار دارد. پس از ثبت سیگنال با اعمال فیلترهای فرکانسی در این بازه فرکانسی سیگنال‌های مطابق شکل (۸) بدست می‌آید.



شکل۷: الف) سلول‌های قلبی انسانی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی (hPSC-derived cardiomyocytes) ب) سلول‌های عصبی pc۱۲

شکل سیگنال‌های سلول‌های قلبی با توجه به رفتار سلول و طول عمر سلول در زمان‌های مختلف متفاوت است و پارامتر مهم مورد بررسی، تعداد نبض‌ها در واحد زمان می‌باشد. در این مقاله تعداد ۲ نبض در هرثانیه بدست آمده است که مطابق با نتایج گزارش شده قبلی می باشد [۲]. همچنین با تطابق شکلی سیگنال‌های عصبی بدست آمده با سیگنال-های دریافت شده از سلول‌های pc۱۲ در مقالات مشابه [۱] در بازه ۴۰۰- تا ۴۰۰ ولت، می‌توان نتیجه گرفت که سیستم ساخته شده دارای الکترودها و سیستم تابش‌دهی مناسب برای ثبت الکتروفیزیولوژی در کاربردهای اپتوزنتیک می‌باشد.



شکل۸: الف) سیگنال دریافتی از سلول‌های قلبی ب) سیگنال دریافتی از سلول عصبی pc۱۲

در این مقاله یک آرایه الکترودی یکپارچه شده با آرایه LED برای ثبت خارج سلولی طراحی و ساخته شده است که در مقایسه با نمونه‌های ساخته شده خارجی [۳]، هزینه ساخت بسیار کم‌تر، پیچیدگی مراحل کم‌تر و نیز قابلیت یکپارچه شدن با سیستم‌های نوری را دارد. همچنین استفاده از دستگاه‌های ثبت اپترود آرایه‌ای می تواند برای بررسی اثر عوامل مختلف بر فعالیت الکتریکی شبکه عصبی و عضله قلبی در حوزه تحقیقات علوم اعصاب و سلول های بنیادی مفید و کارآمد باشد.

مرجع‌ها

[۱] Garma, L. D., Matino, L., Melle, G., Moia, F., De Angelis, F., Santoro, F., & Dipalo, M. (۲۰۱۹). Cost-effective and multifunctional acquisition system for in vitro electrophysiological investigations with multi-electrode arrays. *PloS one*, *14*(۳), e۰۲۱٤۰۱۷.

[۲] Salazar, B. H., Hoffman, K. A., Reddy, A. K., Madala, S., & Birla, R. K. (۲۰۱۸). ۱٦-Channel Flexible System to Measure Electrophysiological Properties of Bioengineered Hearts. *Cardiovascular engineering and technology*, *9*(۱), ۹٤-۱۰٤.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-19]

[۳] Yang, W., Gong, Y., & Li, W. (۲۰۲۰). A Review: Electrode and Packaging Materials for Neurophysiology Recording Implants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, ۱۵۱۵.

[Downloaded from opsi.ir on 2024-04-19]