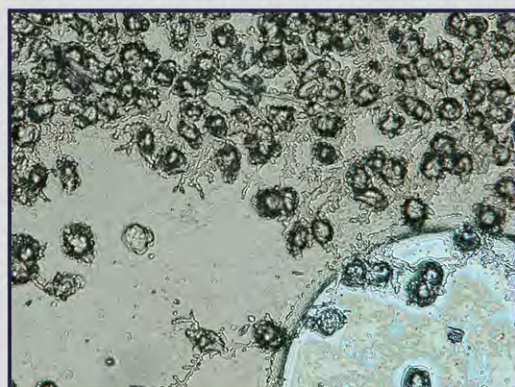
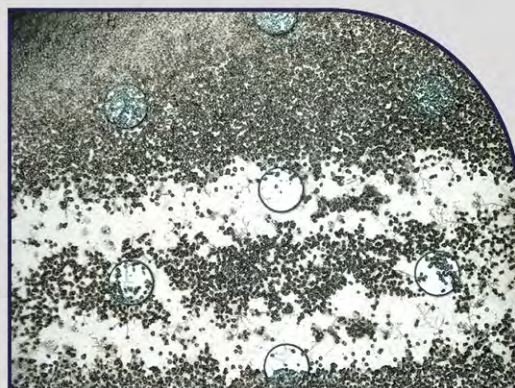


# CIENKOWARSTWOWE PRZETWORNIKI IMPEDANCYJNE

z lokalną kontrolą temperatury  
do hodowli komórkowych

Andrzej Kociubiński



# **CIENKOWARSTWOWE PRZETWORNIKI IMPEDANCYJNE**

z lokalną kontrolą temperatury  
do hodowli komórkowych

## **Rada Naukowa Wydawnictwa Politechniki Lubelskiej**

### **Przewodnicząca:**

Agnieszka Rzepka

### **Dyrektor CINT:**

Katarzyna Weinper

### **Przedstawiciele Dyscyplin Naukowych Politechniki Lubelskiej:**

Marzenna Dudzińska

Małgorzata Franus

Arkadiusz Gola

Beata Kowalska

Grzegorz Komarzyniec

Jarosław Latański

Tomasz Lipecki

Zbigniew Łagodowski

Lucjan Pawłowski

Natalia Przesmycka

Halina Rarot

Magdalena Rzemieniak

Arkadiusz Syta

### **Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej:**

Magdalena Chołojczyk

Karolina Famulska-Ciesielska

Katarzyna Pełka-Smętek

MONOGRAFIE POLITECHNIKI LUBELSKIEJ

# **CIENKOWARSTWOWE PRZETWORNIKI IMPEDANCYJNE**

z lokalną kontrolą temperatury  
do hodowli komórkowych

Andrzej Kociubiński



WYDAWNICTWO  
POLITECHNIKI  
LUBELSKIEJ

Lublin 2026

## Recenzenci:

prof. dr hab. inż. **Jan Dziuban**, Politechnika Wrocławska  
dr hab. inż. **Daniel Tomaszewski**, Sieć Badawcza Łukasiewicz

## Autor:

dr inż. **Andrzej Kociubiński**, ORCID: 0000-0002-0377-8243  
Politechnika Lubelska – ROR: <https://ror.org/024zjzd49>

Redaktor prowadzący: **Karolina Famulska-Ciesielska**

Korekta językowa: **Filip Szałasek**

Skład i łamanie: **Łukasz Maj**

Projekt graficzny serii: **Łukasz Maj**

Zdjęcie na okładce – Andrzej Kociubiński.

O ile nie wskazano inaczej, materiały graficzne (rysunki i zdjęcia) zamieszczone w książce zostały wykonane przez autora.

Publikacja wydana za zgodą **Rektora Politechniki Lubelskiej**

**ISBN:** 978-83-7947-689-3 (wersja drukowana)

**ISBN:** 978-83-7947-690-9 (wersja elektroniczna)

**DOI:** 10.35784/9788379476909

**Wydawca:** Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej  
[www.wpl.pollub.pl](http://www.wpl.pollub.pl)  
ul. Nadbystrzycka 36C, 20-618 Lublin  
tel. (81) 538-46-59



WYDAWNICTWO  
POLITECHNIKI  
LUBELSKIEJ

Książka udostępniona jest na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa –  
na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowe (CC BY-SA 4.0)

**Nakład:** 50 egz.

# Spis treści

|                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Wstęp</b>                                                                             | <b>9</b>   |
| <b>1. Analiza zagadnienia naukowego</b>                                                  | <b>13</b>  |
| <b>2. Metody pomiaru impedancji komórek biologicznych</b>                                | <b>17</b>  |
| 2.1. Pomiary impedancji                                                                  | 18         |
| 2.2. Monitorowanie hodowli komórkowej metodą pomiaru impedancji komórka–podłoże          | 21         |
| 2.3. Model elektryczny hodowli komórkowej                                                | 30         |
| <b>3. Cienkowarstwowe przetworniki w impedancyjnych badaniach hodowli komórkowych</b>    | <b>33</b>  |
| 3.1. Cytometria mikrofluidyczna                                                          | 34         |
| 3.2. Badania biokompatybilności                                                          | 37         |
| 3.3. Technologia podłoża pomiarowego z przetwornikami impedancyjnymi                     | 39         |
| 3.4. Hodowle komórek w obecności różnych metali                                          | 46         |
| 3.4.1. Miedziany przetwornik impedancyjny                                                | 47         |
| 3.4.2. Nikłowy przetwornik impedancyjny                                                  | 57         |
| 3.4.3. Tytanowy przetwornik impedancyjny                                                 | 67         |
| 3.4.4. Chromonikielinowy przetwornik impedancyjny                                        | 73         |
| 3.5. Dyskusja wyników                                                                    | 82         |
| <b>4. Przetwornik impedancyjny z kontrolą temperatury do hodowli komórkowej</b>          | <b>85</b>  |
| 4.1. Mikrogrzejniki – przegląd rozwiązań                                                 | 87         |
| 4.2. Badania nad metodą lokalnej kontroli temperatury w hodowlach komórkowych            | 90         |
| 4.2.1. Realizacja mikrogrzejnika cienkowarstwowego na podłożu ceramicznym                | 92         |
| 4.2.2. Modelowanie układu przetwornik impedancyjny – mikrogrzejnik do hodowli komórkowej | 98         |
| 4.3. Badania nad termicznym uszkodzeniem monowarstwy komórkowej                          | 103        |
| 4.3.1. Mikrogrzejniki z wykorzystaniem płytki PCB                                        | 108        |
| 4.3.2. Dynamiczna praca grzejników                                                       | 111        |
| 4.4. Dyskusja wyników                                                                    | 149        |
| <b>5. Podsumowanie i wnioski</b>                                                         | <b>153</b> |
| <b>Bibliografia</b>                                                                      | <b>159</b> |



## Cienkowarstwowe przetworniki impedancyjne z lokalną kontrolą temperatury do hodowli komórkowych

### Streszczenie

Monografia poświęcona jest opracowaniu oraz eksperymentalnej weryfikacji zintegrowanego układu do impedancyjnego monitorowania hodowli komórkowych *in vitro* z możliwością lokalnej kontroli temperatury. Przedstawione badania koncentrują się na połączeniu cienkowarstwowych przetworników impedancyjnych z mikrogrzejnikiem planarnym, umożliwiającym selektywne i dynamiczne kształtowanie warunków temperaturowych w obrębie pojedynczych naczyń hodowlanych.

W pierwszej części pracy omówiono podstawy teoretyczne impedancyjnego monitorowania hodowli komórkowych. Następnie zaprezentowano projekt i technologię cienkowarstwowych przetworników impedancyjnych wykonanych z różnych metali, wzorowanych na komercyjnych podłożach pomiarowych, wraz z charakterystyką ich parametrów elektrycznych.

Kluczowym elementem monografii jest opracowanie mikrogrzejnika wykonanego z chromonikieliny, zintegrowanego z układem pomiarowym ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing). Zaproponowane rozwiązanie umożliwia lokalne podniesienie temperatury w wybranym naczyniu hodowlanym bez istotnego wpływu na sąsiednie hodowle, co pozwala na prowadzenie równoległych eksperymentów w identycznych warunkach środowiskowych, różniących się wyłącznie temperaturą. Skuteczność lokalnego ogrzewania potwierdzono na podstawie pomiarów termicznych oraz symulacji numerycznych.

W dalszej części przedstawiono wyniki badań hodowli komórkowych prowadzonych w warunkach kontrolowanej temperatury. Zastosowanie techniki impedancyjnej umożliwiło monitorowanie zmian rezystancji, pojemności i impedancji, co pozwoliło na ocenę odpowiedzi biologicznej komórek. Przeanalizowano również możliwość wykorzystania mikrogrzejnika do indukowania lokalnych uszkodzeń termicznych monowarstwy komórkowej w celu symulacji ran oparzeniowych oraz obserwacji procesów regeneracyjnych.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że integracja mikrogrzejnika z przetwornikiem impedancyjnym stanowi efektywne narzędzie badawcze do analizy wpływu temperatury na hodowle komórkowe *in vitro*. Zaproponowany układ umożliwia precyzyjną kontrolę warunków temperaturowych przy jednoczesnym monitorowaniu odpowiedzi biologicznej komórek, co czyni go perspektywnym rozwiązaniem dla zastosowań w badaniach biomedycznych, farmakologicznych oraz inżynierii tkankowej.

**Słowa kluczowe:** cienkowarstwowe przetworniki, mikrogrzejniki, pomiar impedancji komórka–podłoże, ECIS, spektroskopia impedancyjna, lokalne oddziaływanie termiczne

# Thin-film impedance transducers with local temperature control for cell culture

## Abstract

The monograph is devoted to the development and experimental validation of an integrated platform for impedance-based monitoring of *in vitro* cell cultures with the capability of local temperature control. The presented research focuses on combining thin-film impedance transducers with a planar microheater, enabling selective and dynamic shaping of temperature conditions within individual culture vessels.

The first part of the work discusses the theoretical foundations of impedance-based monitoring of cell cultures. Subsequently, the design and fabrication technology of thin-film impedance transducers made of various metals, modeled after commercially available measurement substrates, are presented together with a characterization of their electrical parameters.

A key element of the monograph is the development of a nichrome-based microheater integrated with the ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) measurement platform. The proposed solution enables a local increase in temperature within a selected culture vessel without significantly affecting neighboring cultures, allowing parallel experiments to be conducted under identical environmental conditions differing only in temperature. The effectiveness of local heating was confirmed by thermal measurements and numerical simulations.

The subsequent section presents the results of cell culture experiments conducted under controlled temperature conditions. The application of the impedance technique enabled monitoring of changes in resistance, capacitance, and impedance, allowing assessment of the biological response of the cells. The potential use of the microheater to induce localized thermal damage to the cell monolayer was also analyzed in order to simulate burn wounds and to observe regeneration processes.

The obtained results confirm that the integration of a microheater with an impedance transducer constitutes an effective research tool for analyzing the influence of temperature on *in vitro* cell cultures. The proposed platform enables precise control of temperature conditions while simultaneously monitoring the biological response of cells, making it a promising solution for applications in biomedical research, pharmacology, and tissue engineering.

**Keywords:** thin-film transducers, microheaters, Electric Cell-substrate Impedance Sensing, ECIS, impedance spectroscopy, localized thermal stimulation

# Wstęp

Przymiotnik „cienkie” w określeniu „cienkie warstwy” (ang. *thin film*) jest niejednoznaczny. Zależnie od zastosowania służy do opisu grubości warstw – od pojedynczej warstwy atomowej (tzw. monowarstwy) do warstw o grubościach znacznej części milimetra. Dokładniejsze jest określenie cienkich warstw jako materiałów, które rozciągają się wzdłuż dwóch kierunków, ale są ograniczone wzdłuż trzeciego, a jego wymiar jest wielokrotnie mniejszy od pozostałych [1]. Klasycznym przykładem zastosowania cienkich warstw jest lustro do użytku domowego, które zazwyczaj ma cieką powłokę metalową, aby utworzyć odbity obraz. Proces srebrzenia „na mokro” był kiedyś powszechnie stosowany do produkcji lusterek, a obecnie warstwa metalu jest osadzana za pomocą technik takich jak osadzanie próżniowe. Najstarsze udokumentowane celowo wykonane cienkie warstwy nieorganiczne były otrzymywane ze złota, z myślą o zastosowaniach dekoracyjnych (a później optycznych) przez Egipcjan w środkowej epoce brązu, ponad 5000 lat temu. Złote warstwy o grubościach mniejszych niż 300 nm (~1465 atomów) znaleziono w starożytnych grobowcach, w tym w piramidzie schodkowej Dżesera w Sakkarze na południe od Kairu [2].

Postępy w technikach osadzania cienkowarstwowego umożliwiły szereg przełomów technologicznych w wielu dziedzinach. Powszechne zastosowania, w których wykorzystuje się materiały cienkowarstwowe to [3–6]:

**Przyrządy półprzewodnikowe.** Cienkie warstwy są wykorzystywane do wytwarzania zarówno pojedynczych elementów elektronicznych, takich jak tranzystory, rezystory, diody oraz kondensatory, jak i złożonych układów scalonych. Technologie cienkowarstwowe odgrywają również kluczową rolę w produkcji ogniw słonecznych, które w większości przypadków składają się z wielowarstwowych struktur materiałów fotowoltaicznych. Ponadto na powierzchniach ogniw fotowoltaicznych stosuje się cienkowarstwowe powłoki antyodblaskowe oraz przezroczyste warstwy przewodzące, których zadaniem jest zwiększenie efektywności konwersji energii poprzez redukcję strat optycznych i poprawę zbierania ładunku elektrycznego.

**Przyrządy optyczne.** W celu poprawy właściwości odbiciowych lub transmisyjnych elementów optycznych na ich powierzchniach powszechnie stosuje się powłoki cienkowarstwowe. Warstwy te umożliwiają kształtowanie parametrów optycznych, takich jak współczynnik odbicia i transmisji, w szerokim zakresie długości fal. Przykładem są zwierciadła stosowane w technice laserowej, dla których wymagany współczynnik odbicia może sięgać 99,99%. Z kolei w powłokach antyrefleksyjnych cienkie warstwy wykorzystuje się do redukcji niepożądanych odbić od granic ośrodków, co prowadzi do poprawy jakości obrazu oraz zwiększenia efektywności transmisji. Rozwiązania tego typu znajdują zastosowanie m.in. w okularach korekcyjnych, obiektywach fotograficznych oraz elementach optyki precyzyjnej.

**Narzędzia skrawające.** Aby zapewnić wysoką jakość obróbki skrawaniem, narzędzia skrawające muszą łączyć wysoką twardość, odporność na ścieranie, stabilność termiczną oraz odpowiednią wytrzymałość na pękanie (odporność na wykruszanie). W obróbce z dużymi prędkościami skrawania narzędzia często pokrywa się cienkowarstwowymi powłokami ochronnymi, które dodatkowo poprawiają te właściwości użytkowe. Do najpowszechniej stosowanych materiałów powłokowych należą AlTiN, TiN, TiCN, WC oraz ZrN.

**Ogniwa paliwowe.** Technologie oraz materiały cienkowarstwowe są wykorzystywane w produkcji akumulatorów litowo-jonowych. Technologia cienkich warstw znajduje również zastosowanie w wytwarzaniu wysokoaktywnych katalizatorów poprawiających wydajność ogniw paliwowych.

**Produkcja czujników.** Technologia cienkowarstwowa jest powszechnie stosowana do wytwarzania czujników różnorodnego przeznaczenia: chemicznych, biologicznych, gazowych oraz fizycznych.

**Urządzenia medyczne i biomateriały.** W sektorze medycznym urządzenia i sprzęt są podatne na skażenie mikroorganizmami. Do powlekania powierzchni wyposażenia stosuje się materiały cienkowarstwowe o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych – najczęściej powłoki na bazie srebra, które to chronią je przed kolonizacją drobnoustrojów. Biomateriały, stosowane jako implanty, również są produkowane przy użyciu technologii cienkowarstwowych. Najbardziej popularnym materiałem implantologicznym jest tytan oraz jego stopy, ich zastosowanie bywa jednak ograniczone przez niewystarczające właściwości ściernie i korozyjne. Właściwości powierzchni poprawia się poprzez osadzanie cienkich powłok o wysokiej odporności na ścieranie, np. ceramicznych.

Pomimo szerokiego spektrum zastosowań cienkich warstw w przywołanych powyżej dziedzinach, ich potencjał w kontekście integracji miniaturowych układów pomiarowo-grzejnych dla potrzeb bioanalitiky nie został w pełni wyczerpany. Niniejsza praca wpisuje się w ten nurt badawczy, przedstawiając studium nad wykorzystaniem cienkowarstwowych przetworników impedancyjnych sprzężonych z układem kontroli temperatury. Takie zintegrowane podejście, umożliwiające miniaturyzację struktur pomiarowych, stanowi kluczowy krok w kierunku opracowania instrumentów analitycznych o bardzo małej objętości, zdolnych do równoczesnej realizacji wielu funkcji analitycznych w obrębie jednego układu.



# 1. Analiza zagadnienia naukowego

We współczesnych badaniach biomedycznych obserwuje się dynamiczny rozwój technik impedancyjnych. W tym kontekście szczególnego znaczenia nabierają struktury cienkowarstwowe, których zastosowanie umożliwia miniaturyzację urządzeń. Cienkie warstwy znalazły tu szerokie zastosowanie m.in. w konstrukcji układów do kontroli temperatury oraz w urządzeniach mikroprzepływowych. Szczegółowa analiza tych zagadnień została przedstawiona w dalszych częściach monografii.

Zagadnienie badawcze podjęte w niniejszej pracy koncentruje się na opracowaniu i eksperymentalnej weryfikacji dwufunkcyjnego układu łączącego cienkowarstwowy przetwornik impedancyjny z planarnym mikrogrzejnikiem, przeznaczonego do monitorowania hodowli komórkowych *in vitro* w warunkach kontrolowanej, lokalnie zmienianej temperatury. W odróżnieniu od standardowych systemów inkubacyjnych, które wymuszają jednakowe warunki termiczne we wszystkich hodowlach w komorze, zaproponowane rozwiązanie umożliwia selektywne kształtowanie profilu temperaturowego w obrębie pojedynczych naczyń hodowlanych przy jednoczesnym zachowaniu parametrów środowiskowych (wilgotność, stężenie CO<sub>2</sub>) w pozostałej części układu. Dzięki integracji funkcji pomiarowej i grzewczej w jednej platformie możliwe staje się nie tylko długoterminowe śledzenie parametrów elektrycznych

odzwierciedlających stan biologiczny komórek (impedancji, rezystancji, pojemności), ale również precyzyjne zadawanie bodźca termicznego o kontrolowanej energii i czasie trwania.

W pracy wykorzystano tę właściwość do symulacji urazów termicznych w modelu *in vitro* poprzez lokalne podniesienie temperatury do wartości powodującej utratę adhezji i obumieranie komórek w ograniczonym obszarze monowarstwy, a następnie monitorowanie procesu jej regeneracji za pomocą techniki ECIS (ang. Electrical Cell-substrate Impedance Sensing). Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na identyfikację progów energetycznych oddzielających uszkodzenia odwracalne (po których następuje pełne odtworzenie ciągłej monowarstwy) od nieodwracalnych (kiedy to martwe komórki tworzą barierę uniemożliwiającą migrację). Tym samym praca dostarcza nie tylko nowego narzędzia badawczego do analizy odpowiedzi komórek na stres termiczny, ale również otwiera perspektywę zastosowania opracowanego układu w modelowaniu gojenia ran oparzeniowych oraz w testowaniu potencjalnych czynników terapeutycznych wspomagających regenerację tkanek. Może stanowić to przyczynek do rozwoju zminiaturyzowanych instrumentów analitycznych w kierunku urządzeń dwufunkcyjnych, łączących stymulację termiczną z równoczesną oceną odpowiedzi biologicznej w czasie rzeczywistym.

Przeprowadzone badania dotyczyły analizy kompatybilności biologicznej cienkowarstwowych przetworników impedancyjnych, które są w bezpośrednim kontakcie z hodowlą komórkową. Celem było zbadanie, czy charakterystyki impedancyjne uzyskiwane w takich układach mogą być wiarygodnie powiązane z właściwościami biologicznymi żywych komórek, takimi jak adhezja, proliferacja czy obumieranie. Oceniono skuteczność techniki impedancyjnej w przyjętym rozwiązaniu, wykorzystującym system pomiarowy ECIS Z-Theta oraz cienkowarstwowe elektrody wykonane z czterech różnych materiałów. Analizie poddano zarówno miedź, która jest materiałem uznawanym za krańcowo niekompatybilny biologicznie, jak i materiały powszechnie postrzegane jako potencjalnie biokompatybilne – chromonikielinę, nikiel oraz tytan. Takie podejście umożliwiło nie tylko ocenę przydatności poszczególnych materiałów do zastosowań w hodowli komórkowej, lecz również krytyczną weryfikację powszechnych założeń dotyczących ich biokompatybilności. Zagadnienie to ma istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia interpretacji

wyników, jak i prowadzenia powtarzalnych oraz wiarygodnych eksperymentów biologicznych.

Po potwierdzeniu zasadności zastosowania techniki pomiaru impedancji w analizowanym układzie cienkowarstwowym dalsza część badań została ukierunkowana na jej rozszerzenie o możliwość pracy w kontrolowanych warunkach termicznych. Temperatura jest jednym z podstawowych parametrów środowiskowych determinujących przebieg procesów biologicznych, takich jak metabolizm, proliferacja, różnicowanie czy regeneracja komórek. Standardowe systemy inkubacyjne zapewniają jednorodne warunki temperaturowe w całej komorze, co uniemożliwia prowadzenie równoległych eksperymentów różniących się wyłącznie temperaturą przy zachowaniu identycznych pozostałych warunków hodowli. Wprowadzenie lokalnego ogrzewania pojedynczych naczyń hodowlanych może rozszerzyć możliwości badawcze zastosowanej techniki pomiaru impedancji. Pozwoli ono na prowadzenie równoległych hodowli w zróżnicowanych warunkach temperaturowych w ramach jednej matrycy pomiarowej, a tym samym na niezależną analizę wpływu temperatury na aktywność biologiczną komórek. Realizacja takiego rozwiązania wymaga jednak opracowania mikrogrzejników cienkowarstwowch, które nie będą zakłócać pomiarów impedancyjnych.

W dalszej części pracy badania dotyczyły opracowania układu łączącego impedancyjne monitorowanie hodowli komórkowych z dynamiczną kontrolą temperatury. W tym celu opracowano sposób połączenia w jednym układzie pomiarowym matrycy przetworników impedancyjnych z cienkowarstwowymi mikrogrzejnikami umieszczonymi pod podłożem w obszarach hodowli komórkowej. Tego typu rozwiązanie stwarza możliwość prowadzenia badań nad odpowiedzią komórek na stres termiczny, symulowania uszkodzeń termicznych oraz analizy zdolności regeneracyjnych monowarstw komórkowych. Pozwoliło to na sformułowanie i podjęcie kluczowego pytania badawczego o możliwości wykorzystania impedancyjnej techniki pomiarowej, rozszerzonej o kontrolę temperatury, jako przyszłościowego narzędzia oceny potencjału biologicznego komórek, istotnego w procesach leczenia ran i oparzeń oraz w badaniach nad mechanizmami regeneracji tkanek. Otwiera to również perspektywy zastosowań w badaniach przedklinicznych, medycynie regeneracyjnej oraz w rozwoju narzędzi wspierających terapie personalizowane.



## 2. Metody pomiaru impedancji komórek biologicznych

Jedne z pierwszych pomiarów impedancji wykorzystane do badań biologiczno-medycznych sięgają końca XIX w., kiedy to na spotkaniu British Medical Association w Edynburgu zaprezentowano wyniki prac związanych z wywołanymi przez wzrost drobnoustrojów zmianami w molekularnej koncentracji i przewodności elektrycznej pożywki [7]. W latach 20. XX w. wykazano, że na podstawie pomiarów impedancji zawiesiny krwinek czerwonych można obliczyć rezystywność ich wnętrza oraz pojemność elektryczną błony [8]. Dekadę później zaprezentowano wyniki pomiarów oraz analizę impedancji jaj jeżowca (łac. *Arbacia punctulata*) [9] i żaby lamparciej (łac. *Lithobates pipiens*) [10]. Obecnie pomiary impedancji wykonywane w zakresie różnych częstotliwości stały się podstawą wielu blisko powiązanych technik biologicznych.

Metody pomiaru impedancji zintegrowane z układami mikrofluidycznymi pozwalają na znaczne rozszerzenie badań biologicznych poprzez umożliwienie prowadzenia analiz na pojedynczych komórkach oraz w środowiskach o bardzo małej objętości próbki [11–13].

## 2.1. Pomiary impedancji

Jak ogólnie wiadomo, impedancja jest wyrażana jako stosunek zespolonych reprezentacji zmiennych sinusoidalnie napięcia na zaciskach danego dwójnika i prądu płynącego przez ten dwójnik. Impedancja jest uogólnieniem rezystancji elektrycznej charakteryzującej tę zależność w obwodach prądu stałego:

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)}, \quad (2.1)$$

gdzie:

$\omega$  – pulsacja prądu elektrycznego.

Impedancja jest wielkością zespoloną, której część rzeczywista nosi nazwę rezystancji ( $R$ ), natomiast część urojona – reaktancji ( $X$ ). Rezystancja odpowiada za rozpraszanie energii (straty czynne), a reaktancja za jej magazynowanie w polu elektrycznym lub magnetycznym. Zależność tę opisuje wzór [14]:

$$Z = R + jX, \quad (2.2)$$

gdzie:

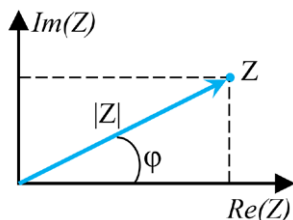
$X$  – reaktancja,

$j$  – jednostka urojona ( $j^2 = -1$ ).

Wartość bezwzględna impedancji oraz przesunięcie fazowe między prądem a napięciem są związane z rzeczywistą ( $Re$ ) i urojoną ( $Im$ ) częścią impedancji w następujący sposób (ryc. 2.1):

$$|Z| = \sqrt{(\operatorname{Re}(Z))^2 + (\operatorname{Im}(Z))^2} \quad (2.3)$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{\operatorname{Im}(Z)}{\operatorname{Re}(Z)}\right). \quad (2.4)$$



**Ryc. 2.1.** Graficzna interpretacja impedancji na płaszczyźnie zespolonej

Część rzeczywista impedancji odpowiada za rozpraszanie energii w dwójniku (rezystancja), natomiast część urojona opisuje energię magazynowaną w polach elektrycznym i magnetycznym elementów pojemnościowych i indukcyjnych wchodzących w jego skład. Gdy część urojona nie jest równa zero, występuje przesunięcie fazowe między prądem i napięciem (ryc. 2.2).

Jednostką zarówno części rzeczywistej, jak i urojonej impedancji w układzie SI jest  $\Omega$ . Impedancja idealnego rezystora jest rzeczywista (ma zerową część urojoną) i wyrażona jest wzorem:

$$Z_R = R. \quad (2.5)$$

Impedancja idealnego kondensatora jest urojona (ma zerową część rzeczywistą) i wyraża się przez:

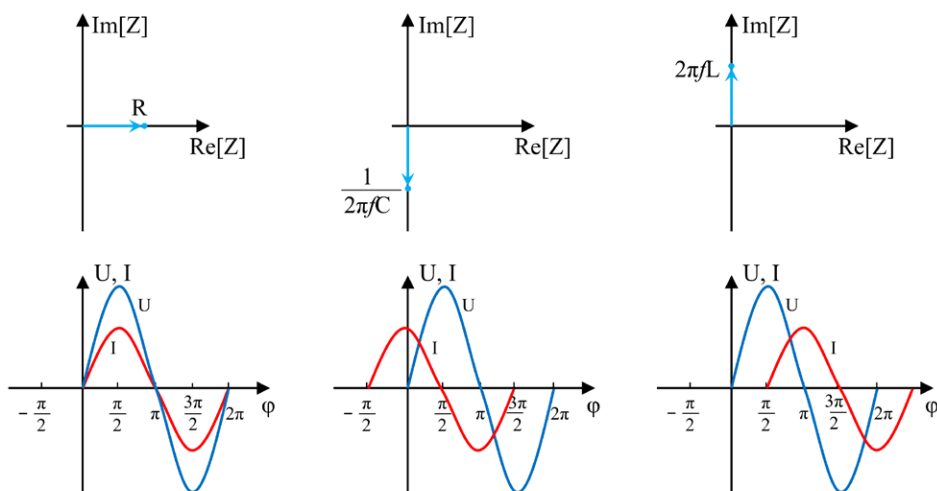
$$Z_C = jX = -j\frac{1}{\omega C}, \quad (2.6)$$

gdzie  $C$  oznacza pojemność kondensatora.

Impedancja idealnej indukcyjności jest urojona (ma zerową część rzeczywistą) i wyrażona jest następującym wzorem:

$$Z_L = jX = j\omega L, \quad (2.7)$$

gdzie  $L$  oznacza indukcyjność cewki.



**Ryc. 2.2.** Graficzna interpretacja impedancji podstawowych elementów obwodu (kolejno) rezystancji  $R$ , pojemności  $C$ , indukcyjności  $L$

Istnieją różne metody pomiaru impedancji, a każda ma pewne wady i zalety, w zależności od oczekiwanej dokładności i prostoty pomiaru, zakresu częstotliwości oraz mierzonej wartości.

Jedną z odmian pomiaru impedancji jest zastosowanie mostków cztero-gałęziowych. Zapewniają one niezależne równoważenie składowych rzeczywistej i urojonej mierzonej impedancji. Elementami wzorcowymi są rezystory i kondensatory. Dokładność tych metod zależy od dokładności i rozdzielczości zastosowanych wzorców.

Wyróżnia się m.in.:

- mostek Wheatstone'a,
- uniwersalne mostki do pomiaru pojemności:
  - szeregowy (de Sauty'ego–Wiena),
  - równoległy (Nernsta),
  - mostek Scheringa,
- mostki do pomiaru indukcyjności:
  - mostek Maxwella–Wiena,
  - mostek Haya [15].

Pomiar impedancji możliwy jest również z wykorzystaniem mostków transformatorowych. W takim układzie napięcia na ramionach mostka są zastępowane przez siły elektromotoryczne indukowane w uzwojeniach wtórnych transformatora, podczas gdy uzwojenie pierwotne jest zasilane napięciem sinusoidalnie zmiennym.

Inne możliwości to:

- zastosowanie rezonansu obwodu i zależności częstotliwości rezonansowej od składowej reaktancyjnej impedancji badanej,
- zastosowanie zależności wartości napięć i prądów w stanie rezonansu od dołączonej rezystancji objawiająca się obniżeniem wierzchołka krzywej rezonansowej,
- określenie charakterystyki krzywej rezonansowej badanej próbki.

Metody rezonansowe są wykorzystywane głównie do pomiaru dobroci cewek, jednak dokładność pomiaru impedancji nie jest zbyt duża.

Obecnie, zamiast regulowania elementów w gałęziach mostka, stosuje się automatyczne układy do pomiaru impedancji, w których regulowane jest napięcie lub natężenie prądu płynącego przez element wzorcowy.

## **2.2. Monitorowanie hodowli komórkowej metodą pomiaru impedancji komórka–podłoże**

Technika monitorowania komórek hodowlanych metodą pomiaru impedancji komórka–podłoże (ECIS) została opracowana przez Ivara Giaevera i Charlesa R. Keese'a, którzy zaprezentowali ją w roku 1984 [16]. Jest to metoda *in vitro*, która umożliwia analizę proliferacji, adhezji, ruchliwości i obumierania komórek w oparciu o ich strukturę, morfologię, zdolność do reprodukcji, podziału lub przemieszczania. Obecnie jest ona stosowana m.in. do określania potencjału metastatycznego komórek rakowych [17–20], pomiaru toksyczności substancji [21, 22] czy testowania leków [23–27].

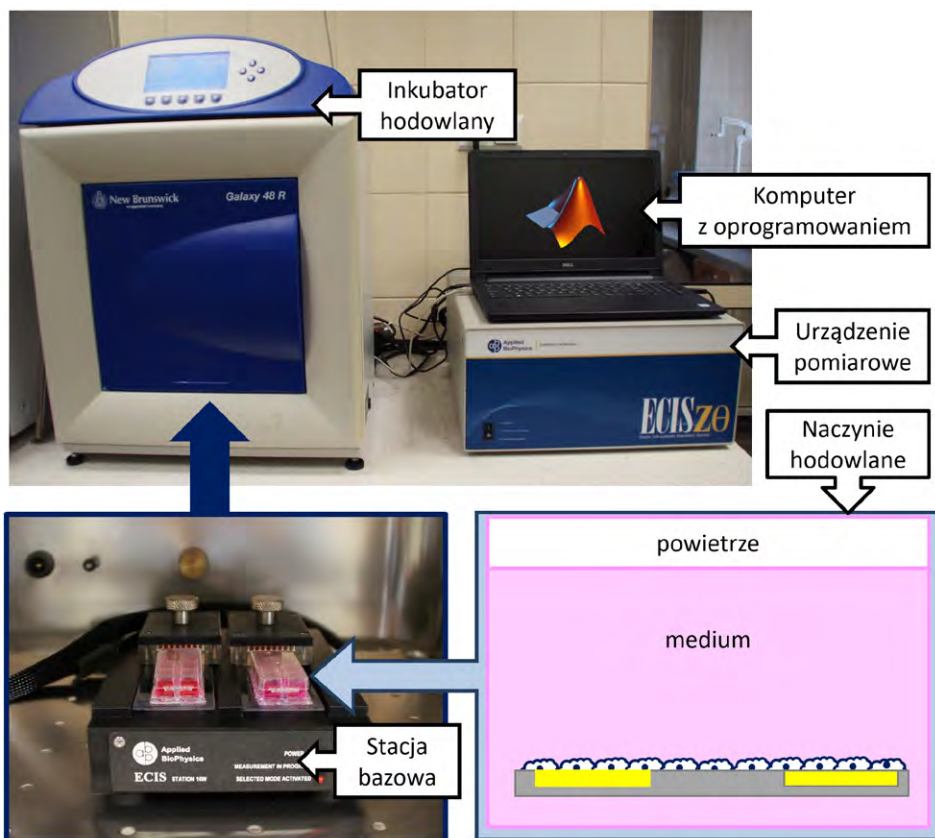
Głównym elementem systemu pomiarowego jest zazwyczaj złota lub platynowa elektroda wytworzona w warstwie metalizacji osadzonej na podłożu testowym, do którego dołączona jest nakładka z przegrodami, tworząc naczynie

do hodowli komórkowej. Często warstwa metalu jest pokryta polimerem izolacyjnym, który ogranicza obszar kontaktu elektrody z hodowlą, co przekłada się na monitorowanie zmian mierzonych parametrów dla mniejszej liczby komórek. Adhezja i rozprzestrzenianie się tych ostatnich na powierzchni elektrody wpływają na przepływ prądu, który zmienia mierzoną wartość impedancji. Jej wahania to ważna informacja dynamiczna o kształcie i mobilności komórek.

Cechami materiału biologicznego wpływającymi na impedancję powyższego układu są:

- adhezja komórek – te dobrze przylegające do podłoża zwiększają rezystancję, blokując przepływ prądu w bliskiej okolicy elektrody;
- morfologia komórek – zmiany kształtu komórek mogą wpływać na przestrzeń międzykomórkową i reaktancję układu.
- proces proliferacji – zwiększa liczbę komórek, a tym samym wywołuje zmianę impedancji.

W przypadku systemu pomiarowego ECIS Z-Theta powszechnie stosowane podłoża testowe zawierające elektrody pomiarowe wykonane są z poli(tereftalanu etylenu), tzw. PET, lub poliwęglanu Lexan™ [26]. Są to podłoża jednorazowego użytku umieszczane w stacji bazowej do obsługi wielokanałowych matryc pomiarowych. Wyposażona jest w elektrody typu pogo pin (styki sprężynowe), zapewniające połączenie elektryczne z polami kontaktowymi wykonanymi przy jednej z krawędzi. Stacja bazowa jest umieszczana w inkubatorze hodowlanym (ryc. 2.3) zapewniającym optymalne warunki środowiskowe, niezbędne do przeprowadzenia hodowli. Standardowe warunki hodowlane to: temperatura 37 °C i atmosfera z zawartością CO<sub>2</sub> wynoszącą 5%.

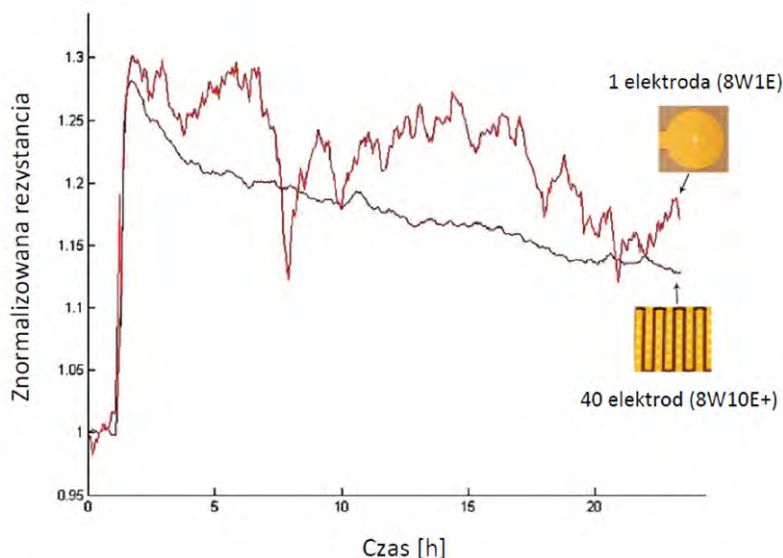


**Ryc. 2.3.** System pomiarowy ECIS Z-Theta (u góry), inkubator ze stacją bazową zawierającą dwa gniazda na podłoża z naczyniami (na dole po lewej) oraz schematyczny przekrój naczynia hodowlanego z medium i elektrodami pomiarowymi pokrytymi komórkami (na dole po prawej)

W układzie pomiarowym stosuje się źródło prądu przemiennego o wartości skutecznej mniejszej od 1 mA, które zasila przetwornik impedancyjny, a mierzonym sygnałem wyjściowym jest napięcie występujące na elektrodach pomiarowych. Komórki są dodawane do naczynia hodowlanego z pożywką. W miarę ich wzrostu i namnażania oraz jednoczesnej adhezji do dna naczynia z elektrodami wartość mierzonego napięcia rośnie w sposób zależny od liczby komórek pokrywających elektrody oraz ich morfologii.

Podłoża z elektrodami (ang. *disposable electrode arrays*) firmy Applied BioPhysics, przeznaczone do zastosowań w urządzeniach pomiarowych ECIS,

charakteryzują się zróżnicowaną geometrią oraz wymiarami złotej elektrody pomiarowej i przeciwelektrody (ryc. 2.4–2.5) [28].

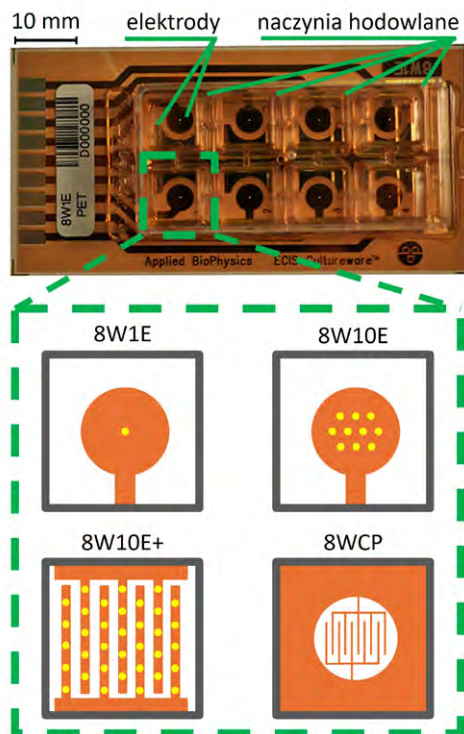


**Ryc. 2.4.** Znormalizowana rezystancja jednorodnych warstw komórkowych w funkcji czasu po dodaniu świeżej pożywki – porównanie dwóch krzywych uzyskanych dla elektrod o różnej konstrukcji i rozmiarze [28]

Małe powierzchnie umożliwiają monitorowanie nieskorelowanych zmian morfologicznych w skali pojedynczych komórek lub bardzo małych populacji komórkowych ( $< 100$ ). Z kolei elektrody o większej powierzchni lub układy wieloelektrodowe zapewniają uśrednioną odpowiedź morfologiczną licznych populacji komórek ( $> 1000$ ). Ponadto elektrody mogą być wykorzystywane do generowania pola elektrycznego niezbędnego do przeprowadzania procesów elektroporacji lub niszczenia komórek m.in. w badaniach migracji komórkowej [28–32].

W metodzie pomiarowej ECIS stosowane są różnorodne konstrukcje elektrod oraz opracowano wiele rozszerzeń technicznych tej metody w zależności od zastosowań [28, 33–37]. Przykładem może być wytworzenie na podłożu dielektrycznym cienkowarstwowych ścieżek rezystancyjnych z platyny do jednoczesnego monitorowania zmian temperatury i impedancji, do testowania reakcji cieplnej po podaniu leku przeciwnowotworowego [38]. Prowadzono

również badania z pokrywaniem elektrod grafenem ze względu na jego biokompatybilność, elastyczność oraz możliwość rozszerzenia zakresu częstotliwości pomiarów dwuelektrodowych do niskich częstotliwości [39–41].



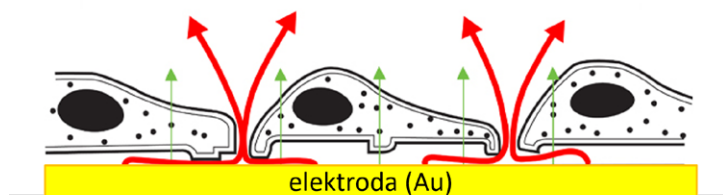
**Ryc. 2.5.** Komercyjne podłoże 8W1E firmy Applied Biophysics, Inc. (u góry) oraz schemat konstrukcji elektrod na podłożach o oznaczeniach 8W1E, 8W10E, 8W10E+, 8WCP (u dołu)

Innym rozwiązaniem jest zastosowanie przezroczystej elektrody z materiału przewodzącego prąd, jak np. tlenek indowo-cynowy (ITO) [42–44]. Umożliwia to połączenie systemu pomiarowego ECIS z mikroskopem optycznym. Obserwacje mikroskopowe pozwalają na wizualną kontrolę przylegania pomiędzy komórkami oraz połączenia komórka–podłoże, co uzupełnia odczyty pomiarów impedancyjnych. Elektrody ITO charakteryzują się biokompatybilnością porównywalną ze złotem, podobnymi możliwościami detekcji elektrycznej oraz doskonałymi właściwościami optycznymi dla większości metod obrazowania komórek; można je z powodzeniem stosować wszędzie

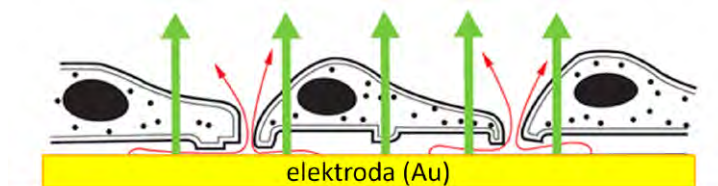
tam, gdzie konieczne jest połączenie szerokiej analizy mikroskopowej z pomiarami impedancji.

Eksperymenty metodą ECIS są przeprowadzane w trybie spektroskopowym. Impedancja badanej populacji komórek jest rejestrowana w pewnym zakresie częstotliwości, zazwyczaj od 10 Hz do 100 kHz. Dla uproszczenia można przedstawić komórki za pomocą modelu zastępczego w postaci równoległego połączenia rezystora i kondensatora. W związku z przyjęciem tego modelu na wszystkich rycinach i wykresach w dalszej części pracy zastosowano umowne wartości rezystancji  $R$  i pojemności  $C$ , co pozwala uprościć wywód.

Przy częstotliwościach poniżej 2 kHz znaczna część prądu przepływa przez przestrzenie międzykomórkowe, dostarczając informacji o przyleganiu komórek do podłoża. Wykorzystanie sygnału o częstotliwościach rzędu  $\sim 40$  kHz powoduje przepływ prądu bezpośrednio przez błonę komórkową. W efekcie uzyskuje się informację o wielkości pokrycia elektrod przez komórki. Impedancja przy wyższych częstotliwościach zależy w większym stopniu od pokrycia elektrod komórkami, co czyni ją użyteczną do określania wskaźników wzrostu komórek i cytotoksyczności, natomiast niska częstotliwość jest stosowana przy oznaczaniu zmian w przestrzeniach pod komórkami lub między nimi. Na rycinie 2.6 czerwone strzałki reprezentują przepływ prądu jonowego i przemieszczającego się w przestrzeniach roztworu między elektrodą a podstawną błoną plazmatyczną, a następnie przez przestrzenie między komórkami. Z kolei zielone strzałki na rycinie 2.7 wskazują kierunek prądu zmiennego, który przepływa pojemnościowo przez błony komórkowe. Jest to uproszczony model stosowany w przypadku zastosowania metody ECIS, który nie obejmuje szeregu zjawisk, np. przepływu prądu przez roztwór czy po powierzchni błony komórkowej [45–48].



**Ryc. 2.6.** Przy niskiej częstotliwości prądu przemiennego (2 kHz) impedancja membrany jest wysoka i większość prądu przepływa pod i między komórkami [45]



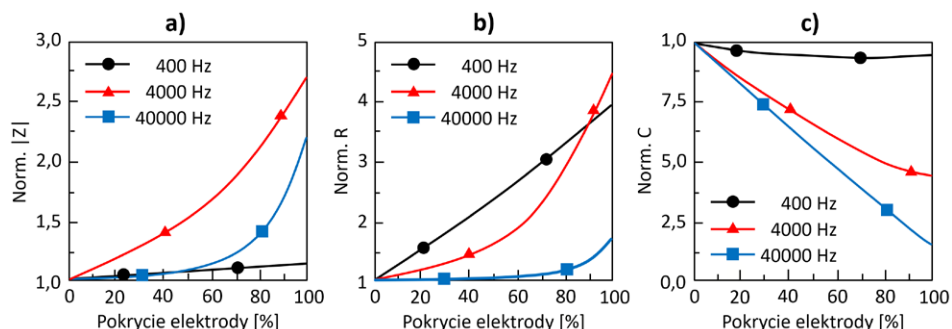
**Ryc. 2.7.** Przy wysokiej częstotliwości prądu przemiennego (~40 kHz) większość prądu przepływa pojemnościowo przez błony komórkowe [45]

Czas trwania eksperymentu jest zależny od założeń badawczych i może wynosić od kilku sekund do kilku dni. Automatyczna akwizycja danych eliminuje konieczność stałej obecności personelu w laboratorium w trakcie prowadzenia pomiarów. Jedynym praktycznym ograniczeniem czasu obserwacji pozostaje konieczność okresowej wymiany pożywki hodowlanej (medium), standardowo co 2–3 dni [24].

W każdym punkcie czasowym eksperymentu dla wszystkich częstotliwości wyznaczane są trzy parametry (impedancja  $Z$ , rezystancja  $R$ , pojemność  $C$ ). Zmierzone parametry zawierają różne informacje, bo przepływ prądu (przez komórki lub wokół nich) determinuje częstotliwość zadanego sygnału, toteż ważne jest dostosowanie częstotliwości sygnału do monitorowanych zmian hodowli, np. proliferacji komórek lub ich śmierci. W istniejącej literaturze dotyczącej metody ECIS, większość danych została zarejestrowana przy częstotliwości  $f = 4$  kHz, ponieważ uznano, że ta wartość jest najbardziej czuła dla najczęściej używanych linii komórkowych przy typowych rozmiarach elektrod  $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$  (matryca oznaczona symbolem 8W1E) lub  $5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$  (8W10E). Co więcej, przy tej wartości złożona impedancja może być mierzona bardzo dokładnie bez znaczących zakłóceń. W ciągu ostatnich lat uznano jednak, że pomiary przy 400 Hz i 40 kHz mogą być bardziej użyteczne dla niektórych zastosowań [48, 49].

Metodą ECIS można zilustrować pokrycie elektrody komórkami i zachodzące w nich zmiany morfologiczne w trakcie adhezji do jej powierzchni. Badania obejmujące proliferację komórek dają możliwość jej określenia za pomocą pomiarów elektrycznych w funkcji czasu, w związku z czym powinno się adekwatnie dobrać częstotliwość monitorowania i mierzoną wielkość elektryczną używane do analizy danych.

Ilustracją powyższych zależności są wyniki przedstawione na rycinie 2.8 [48] – pokazano parametry impedancji  $|Z|$ , rezystancji  $R$  i pojemności  $C$  dla trzech częstotliwości: 400 Hz, 4 kHz i 40 kHz w funkcji pokrycia elektrody komórkami. Wartości  $|Z|$ ,  $R$  i  $C$  zostały znormalizowane do wartości zmierzonej na elektrodzie bez komórek (0% pokrycia elektrody).

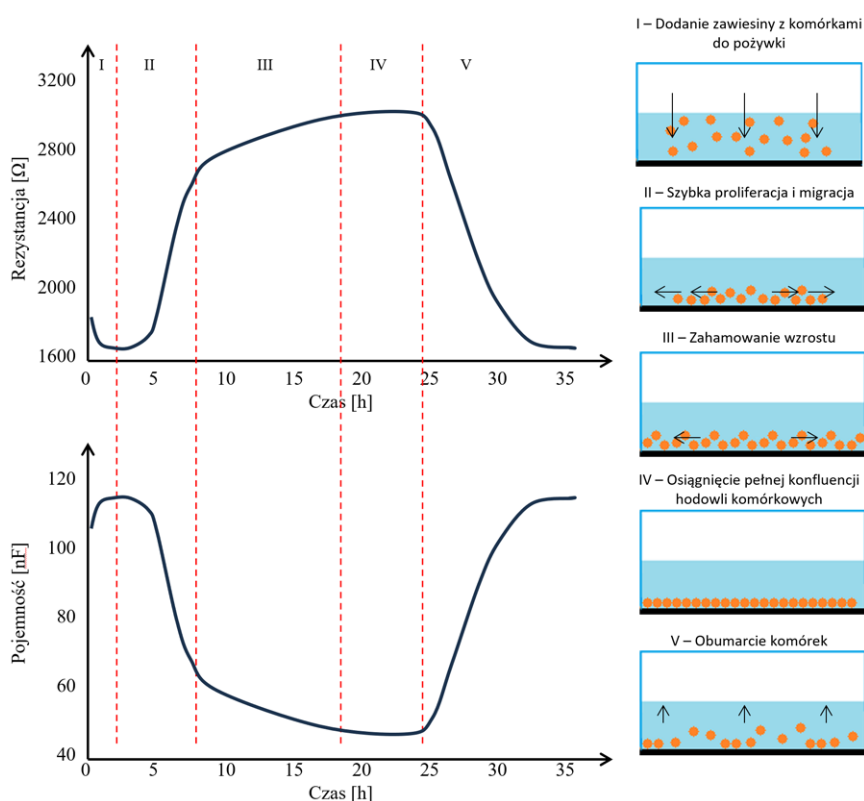


**Ryc. 2.8.** Zależność znormalizowanych: a) modułu impedancji, b) rezystancji, c) pojemności od stopnia pokrycia elektrod komórkami. Krzywe wyznaczono na podstawie modelu ECIS dla trzech różnych częstotliwości [24, 48]

Na rycinie 2.8a przedstawiono znormalizowaną impedancję przy częstotliwości sygnału 400 Hz, która wykazuje niewielką zależność od stopnia pokrycia elektrody komórkami. Przy częstotliwości 4 kHz czułość pomiaru jest wyraźnie większa, jednak znormalizowana impedancja wykazuje nieliniową zależność od powierzchni elektrody zajętej przez komórki. Przy najwyższej analizowanej częstotliwości ( $f = 40$  kHz) nieliniowość tej zależności jest jeszcze bardziej wyraźna. Oznacza to, że proliferacja komórek oraz stopniowe pokrywanie elektrody mogą być monitorowane na podstawie zmian impedancji, jednak interpretacja wyników może wymagać złożonej procedury kalibracyjnej. Analogiczne obserwacje dotyczą rezystancji (ryc. 2.8b). Przy częstotliwościach 400 i 4000 Hz możliwe jest śledzenie procesu pokrywania elektrody z wystarczającą czułością, przy czym rezystancja mierzona przy częstotliwości 400 Hz wykazuje zależność niemal liniową od stopnia pokrycia.

Na rycinie 2.8c przedstawiono zależność znormalizowanej pojemności od stopnia pokrycia elektrody komórkami dla trzech rozpatrywanych częstotliwości. Podczas gdy znormalizowana pojemność przy 400 Hz jest praktycznie nieczuła

na zmiany pokrycia elektrody, to odczyty dla częstotliwości 4 kHz i 40 kHz wykazują wyraźny wzrost czułości pomiaru. Co więcej, odczyty pojemności przy najwyższej częstotliwości wykazują trend zbliżony do liniowego. Innymi słowy, pomiar pojemności w tym zakresie częstotliwości dobrze odzwierciedla stopień pokrycia elektrody i jest wprost proporcjonalny do powierzchni zajmowanej przez komórki. Zgodnie z powszechną praktyką opisaną w literaturze oraz zgodnie z zaleceniami producenta systemów pomiarowych ECIS impedancję prezentuje się zazwyczaj dla częstotliwości  $f = 16$  kHz, rezystancję przy  $f = 4$  kHz, a pojemność dla  $f = 64$  kHz [48].



**Ryc. 2.9.** Oczekiwany charakter zmian mierzonej rezystancji dla sygnału o częstotliwości  $f = 4$  kHz i pojemności dla  $f = 64$  kHz. Wraz ze wzrostem mierzonej wartości rezystancji, wartość mierzonej pojemności maleje. W pierwszej fazie zawiesina z komórkami dodawana jest do naczynia z pożywką (I). Następnie komórki w dynamicznym tempie migrują po powierzchni dna pojemnika, rozmnażając się (II). Po tym etapie wzrost komórek zwalnia (III), następnie formują one monowarstwę na dnie naczynia (IV). Ostatnim etapem cyklu życia komórek jest ich obumaranie i utrata adhezji do podłoża (V) [50]

Na rycinie 2.9 przedstawiono przykłady przebiegów rezystancji i pojemności zarejestrowane podczas typowego badania potencjału proliferacyjnego komórek w hodowli, a także wyróżniono pięć charakterystycznych faz procesu. Po dodaniu komórek do naczynia hodowlanego (faza I) komórki swobodnie unoszą się w pożywce, a następnie opadają i przylegają do dna naczynia oraz powierzchni elektrod (II). W kolejnej fazie następuje intensywna proliferacja komórek (III), prowadząca do stopniowego zwiększania stopnia pokrycia elektrody, aż do utworzenia się ciągłej i jednorodnej monowarstwy komórkowej (IV). W końcowej fazie obserwuje się obumarcie komórek i utratę adhezji do podłoża (V).

### 2.3. Model elektryczny hodowli komórkowej

W zdecydowanej większości układów biologicznych *in vitro* żywe komórki występują w dwóch podstawowych stanach fizycznych: w postaci zawiesiny w płynnej pożywce lub jako warstwa przylegająca (adherentna) do powierzchni podłoża. Wybór metody pomiarowej jest determinowany głównie przez typ hodowli (zawiesinowa vs. adherentna) oraz stan komórek. Pomimo tej różnorodności metodologicznej, podstawowe modele teoretyczne opisujące interakcję komórek z polem elektrycznym i stanowiące podstawę interpretacji danych są zbliżone dla większości technik pomiaru impedancji. W technice impedancyjnej ECIS elektrody występują w wielu konfiguracjach, posiadają zróżnicowane wymiary i znajdują się w różnych odległościach od siebie. Wprowadzono kilka modeli matematycznych do analizy związku pomiędzy mierzoną wartością impedancji komórki a morfologią i zachowaniem komórek [16, 23, 28, 51–58].

Do wyznaczenia w sposób przybliżony całkowitej impedancji komórek pokrywających elektrodę w modelu przedstawionym schematycznie na rycinie 2.10 można zastosować metodę elementów skończonych. Aby przeanalizować widma impedancji uzyskane za pomocą metody ECIS, opracowano funkcję opartą na wyprowadzeniu równań różniczkowych i odpowiadających im warunków brzegowych [24, 51, 59]:

$$\frac{1}{Z_c} = \frac{1}{Z_n} \left( \frac{Z_n}{Z_n + Z_m} + \frac{\frac{Z_m}{Z_n + Z_m}}{\frac{\gamma I_0(\gamma r_c)}{2I_1(\gamma r_c)} + R_b \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right), \quad (2.8)$$

gdzie:

$Z_n$  – impedancja elektrody bezkomórkowej,

$I_0, I_1$  – zmodyfikowane funkcje Bessela pierwszego rodzaju, rzędu 0 i 1,

$R_b$  – rezystancja między komórkami.

Parametr  $Z_m$  jest impedancją błony plazmatycznej, która wynosi:

$$Z_m = \frac{1}{j\omega C_m}, \quad (2.9)$$

gdzie:

$C_m$  – pojemność błony komórkowej, zależna od jej składu i morfologii.

Z kolei  $\gamma r_c$  określone jest wzorem:

$$r_c \gamma = r_c \sqrt{\frac{\rho}{h} \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} = \alpha \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}}, \quad (2.10)$$

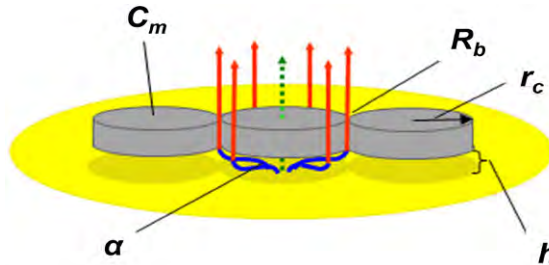
gdzie:

$\rho$  – rezystywność medium względem hodowli komórkowej,

$h$  – odległość pomiędzy dolną powierzchnią komórki a podłożem,

$r_c$  – promień komórki,

$\alpha = r_c \sqrt{\rho/h}$  [59].



**Ryc. 2.10.** Schemat badanego układu komórek z parametrami  $C_m, R_b, \alpha$ , w którym komórki traktowane są jako dyski o promieniu  $r_c$  i odległości od powierzchni elektrody o wartość  $h$  [59]

Parametr  $\alpha$  (ryc. 2.10) jest miarą ograniczenia przepływu prądu w szczelinie pod komórkami. Wartość ta zależy od promienia komórki  $r_c$ , średniej odległości  $h$  komórki od powierzchni elektrody oraz rezystywności  $\rho$  elektrolitu w przestrzeni pod komórkami.

Parametr  $R_b$  jest rezystancją w szczelinach między komórkami i zależy od szczelności połączeń międzykomórkowych. Zmiany długości promienia komórki również mogą wpływać na  $R_b$ , zmniejszenie całkowitej sumy przestrzeni międzykomórkowych zwiększa bowiem rezystancję warstwy komórek. Właściwości membrany są reprezentowane przez parametr  $C_m$ , na który wpływa skład i morfologia błony komórkowej. Wygodnie jest interpretować zmierzoną impedancję próbki jako równoważną impedancji kondensatora i rezystora połączonych szeregowo. W rzeczywistości komórki nie są ani okrągłe, ani prostokątne – ich kształty są zróżnicowane i w trakcie trwania hodowli układają się niejednakowo względem siebie. Ten uproszczony model matematyczny pokazuje jednak, że zmiana impedancji spowodowana przez jednorodną warstwę komórek wynika z dwóch źródeł: przepływu prądu między powierzchnią komórek a podłożem oraz rezystancji między komórkami [24, 60].

### 3. Cienkowarstwowe przetworniki w impedancyjnych badaniach hodowli komórkowych

W niniejszym rozdziale przedstawiono badania mające na celu ocenę wpływu materiału elektrod impedancyjnego przetwornika pomiarowego na właściwości biologiczne komórek hodowlanych monitorowanych z wykorzystaniem techniki impedancyjnej ECIS. Omówiono technikę cytometrii mikroprzepływowej oraz zagadnienie biokompatybilności materiałów stosowanych do wytwarzania elektrod pomiarowych, stanowiące istotne aspekty projektowania układów do badań *in vitro*.

W ramach badań wykorzystano system pomiarowy ECIS Z-Theta oraz zaprojektowano i wykonano zestaw podłoży z cienkowarstwowymi elektrodami grzebieniowymi osadzonymi techniką rozpylania magnetronowego z użyciem różnych metali. Badania miały na celu określenie, czy możliwa jest analiza zachowań komórek hodowanych, które pozostają w kontakcie z metalami indukującymi zróżnicowaną odpowiedź biologiczną — od toksycznej miedzi, przez umiarkowanie reaktywne nikiel i chromonikielinę, po wykazujący wysoką biokompatybilność tytan [61, 62].

Hodowle przeprowadzono dla dwóch linii komórkowych: mysich fibroblastów L929 oraz małych komórek nerkowych VERO. W trakcie prac badawczych rejestrowano parametry elektryczne układu elektroda–komórki, takie jak impedancja, rezystancja oraz pojemność, umożliwiające ocenę wpływu

zastosowanego materiału na przebieg procesów biologicznych w hodowli komórek w rezultacie zastosowania metali o odmiennych właściwościach. Możliwość zaobserwowania proliferacji komórek i ich rozprzestrzeniania się na powierzchni elektrod umieszczonych na dnie naczynia stwarza warunki pozwalające na ocenę ich zachowania w kontakcie z różnymi materiałami. Taka obserwacja otwiera perspektywę wykorzystania zaprezentowanej metody jako narzędzia wstępnej oceny biogodności materiałów oraz identyfikacji potencjalnych kierunków dalszych badań w zakresie interakcji materiał–komórka.

### **3.1. Cytometria mikrofluidyczna**

Cytometria to technika zajmująca się określaniem właściwości komórek [63]. Cytometria wykorzystująca techniki mikrofluidyczne (zwana czasem mikrocytometrią) jest obecnie jednym z najnowocześniejszych obszarów badań, na co wskazuje ogromny udział doniesień naukowych na ten temat m.in. w materiałach wiodącej konferencji branżowej: International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences – Micro-Total Analysis Systems ( $\mu$ TAS).

Cytometria mikrofluidyczna umożliwia pomiar nielicznej grupy oraz pojedynczych komórek w układach znacznie mniejszych niż tradycyjne cytometry przepływowe, co czyni ją szczególnie atrakcyjną w badaniach wymagających wysokiej czułości, niskiego zużycia próbek oraz łączenia wielu funkcji w jednym układzie [64–67].

Wyróżnia się trzy główne typy rozwiązań: przepływowe, stacjonarne oraz przepływowo-stacjonarne, różniące się sposobem organizacji analizy komórek [68, 69]. Mikrocytometria przepływowa opiera się na zasadach klasycznej cytometrii przepływowej, lecz w znacznie mniejszej skali. Komórki zawieszone w cieczy przepływają przez cienkie kanały mikroprzepływowe, gdzie mogą być analizowane pojedynczo przy użyciu różnorodnych detektorów. Tego rodzaju systemy umożliwiają szybką analizę dużych populacji komórek w czasie rzeczywistym, dzięki czemu są przydatne zwłaszcza w diagnostyce medycznej, analizie krwi czy badaniach przesiewowych [70].

Mikrocytometria stacjonarna polega na analizie komórek unieruchomionych na powierzchni. Pozwala to na szczegółową obserwację ich morfologii,

ekspresji białek lub dynamiki procesów biologicznych. Taka metoda jest szczególnie cenna w badaniach podstawowych nad cyklem komórkowym, migracją komórek czy działaniem leków [49].

Trzeci typ, czyli mikrocytometria przepływowo-stacjonarna, łączy zalety obu poprzednich podejść. W tym układzie komórki najpierw przepływają przez kanał mikroprzepływowy, a następnie są selektywnie zatrzymywane w wyznaczonym obszarze, gdzie przeprowadza się ich dokładną analizę. Pozwala to na wstępną selekcję interesujących komórek z dużej populacji oraz ich dalszą, bardziej szczegółową charakterystykę [71, 72].

Badanie komórek w „mikroskali” może być realizowane z wykorzystaniem zróżnicowanych metod detekcji, obejmujących m.in. techniki optyczne, mechaniczne, elektrochemiczne, elektroforetyczne oraz impedancyjne, z których każda dostarcza informacji o stanie i funkcjonowaniu komórek.

Techniki optyczne, w tym fluorescencja, spektroskopia absorpcji oraz pomiary oparte na rozpraszaniu i odbiciu światła, stanowią fundamentalną podstawę działania współczesnych układach cytometrycznych [73–75]. Wykorzystywane są zaawansowane techniki mikroskopowe, które umożliwiają obserwację i akwizycję danych z dużą szybkością, w wysokiej rozdzielczości i na szerokim obszarze obrazowania. Równocześnie rozwijane są różnorodne metody analizy obrazów, w tym bazujące na algorytmach uczenia maszynowego [76, 77].

W biologii komórkowej kluczowe znaczenie mają następujące techniki obrazowania: mikroskopia konfokalna [74, 78], dwufotonowa [79, 80], z użyciem światła warstwowego [81–83] i akustyczna [84, 85].

Wykorzystywane w biomechanice techniki mechaniczne dostarczają informacji o właściwościach komórki, takich jak sztywność, elastyczność, deformowalność czy odpowiedź na przyłożone siły mechaniczne. Cechy te mają istotne znaczenie w wielu procesach biologicznych, którym podlegają komórki, zarówno prawidłowych, jak i chorobowych [86–99].

Techniki elektrochemiczne – stosowane często w konfiguracji mikroprzepływowej z miniaturowymi elektrodami – umożliwiają analizę procesów biologicznych, takich jak reakcje redoks, transport jonów przez błony czy aktywność enzymów. Techniki te obejmują: amperometrię, potencjometrię, voltamperometrię, spektroskopię impedancyjną oraz elektrochemiluminescencję [100–102].

Metody elektroforetyczne opierają się na oddziaływaniach pomiędzy komórkami a niejednorodnym polem elektrycznym. W warunkach zmiennego pola różnice w polaryzowalności komórek umożliwiają ich przemieszczanie, separację lub sortowanie bez konieczności znakowania [103–105].

Pomiar impedancji żywych komórek w hodowlach laboratoryjnych stosuje się coraz częściej, ponieważ jest to stosunkowo małoinwazyjna metoda analityczna do oceny ich stanu [12, 106–109]. Zwykle stosowane są metody pojemnościowe, które pozwalają na wykonanie pomiaru impedancji w szerokim zakresie częstotliwości. Każda z nich ma swoje specyficzne zalety i ograniczenia, a ich wybór zależy od celu badania, wymaganej rozdzielczości i dostępnego sprzętu. Najczęściej stosowane techniki pomiaru impedancji do monitorowania komórek to:

- impedancyjna cytometria przepływowa (ang. *impedance flow cytometry*, IFC), znana jako licznik Coultera – metoda zliczania oraz określania wielkości różnego rodzaju komórek i cząstek zawieszonych w płynącym elektrolicie, bazująca na pomiarze impedancji w obszarze otworu apertury. Zmiany rezystancji elektrycznej zachodzą, gdy pojedyncze komórki przepływają przez wąski otwór (kapilarę) umieszczony pomiędzy dwiema elektrodami. Każde przejście komórki powoduje krótkotrwały impuls elektryczny, którego amplituda odpowiada objętości komórki, a analiza sygnału pozwala określić ich liczbę, wielkość oraz – w bardziej zaawansowanych systemach – także właściwości biofizyczne [110, 111];
- elektryczna spektroskopia impedancyjna (ang. *electric impedance spectroscopy*, EIS) – metoda polegająca na analizie odpowiedzi układu elektrycznego lub biologicznego na przyłożone napięcie zmienne o zmiennej częstotliwości, w ramach której impedancję mierzy się w funkcji częstotliwości sygnału, dzięki czemu EIS pozwala uzyskać szczegółowe informacje o właściwościach elektrochemicznych materiałów, takich jak przewodnictwo jonowe, polaryzacja elektrod, procesy dyfuzyjne czy interakcje na granicy faz [7];
- pomiar impedancji komórka–podłoże (ECIS) [16, 107].

### 3.2. Badania biokompatybilności

Biokompatybilność, inaczej biozgodność, to właściwość materiałów lub substancji, która warunkuje ich prawidłowe funkcjonowanie i długotrwałą stabilność w środowisku biologicznym [112]. Pojęcie to obejmuje zdolność materiału do współistnienia z organizmem bez wywoływania negatywnych reakcji, takich jak toksyczność, odpowiedź immunologiczna, hemoliza czy reakcje zapalne. Dawniej termin ten odnosił się jedynie do materiałów wszczepianych do organizmów, współcześnie jego znaczenie jest dużo szersze i opisuje zdolność materiału do wywoływania odpowiednio zrównoważonej, akceptowalnej odpowiedzi biologicznej w określonym kontekście zastosowania.

Podstawowym wymaganiem stawianym biomateriałom jest ich chemiczna i biologiczna obojętność wobec środowiska fizjologicznego, co w przypadku zarówno komórek odzwierzęcych, jak i ludzkich oznacza warunki panujące w organizmie (pH ok. 7,4; temperatura 37 °C) [113]. Istotnym kryterium pozostaje również brak właściwości kancerogennych, cytotoksycznych oraz zdolności do inicjowania reakcji alergicznych. Biokompatybilność materiału zależy nie tylko od jego składu chemicznego, ale także od właściwości powierzchniowych, takich jak zdolność do adsorpcji białek, wspieranie adhezji komórek oraz ich proliferacji. W celu zwiększenia biozgodności materiałów często stosuje się techniki modyfikacji powierzchni, które mogą m.in. zmniejszyć ryzyko korozji, poprawić integrację z otaczającymi tkankami, a także ograniczyć odpowiedź zapalną [114–118].

Z powyższych względów termin „biokompatybilność” nie obejmuje wszystkich możliwych zależności występujących pomiędzy materiałem a organizmem żywym, dlatego też powinien być dodatkowo opisywany definicjami uzupełniającymi [119–121]. Przykładowo dane dotyczące toksyczności pierwiastków chemicznych najczęściej odnoszą się do ekspozycji wynikającej z przyjmowania ich drogą pokarmową lub poprzez narażenie środowiskowe – kontakt ze skórą czy inhalację – tymczasem właściwości materiału wprowadzanego do organizmu w formie implantu mogą znacząco odbiegać od tych warunków zarówno pod względem formy chemicznej (np. stopień utlenienia), fizycznej (np. postać cząsteczkowa, jonowa, amorficzna), jak i dynamiki uwalniania substancji (np. dawka, tempo dyfuzji) [122–124]. Parametry te mogą być nieznane lub

trudne do jednoznacznego określenia, co znacząco utrudnia przewidywanie potencjalnych efektów biologicznych i ocenę rzeczywistego ryzyka toksykologicznego związanego z danym materiałem implantacyjnym [125, 126].

Przykładem materiału powszechnie uznawanego za wykazujący wysoką biogodność jest platyna, która ze względu na swoje właściwości elektrochemiczne i stabilność chemiczną była przez długi czas materiałem powszechnie stosowanym w urządzeniach medycznych. Zakładano, że nie ulega ona istotnemu rozpuszczaniu w warunkach fizjologicznych, co stanowiło podstawę szerokiego zastosowania, w ostatnich latach pojawiły się jednak doniesienia kliniczne dokumentujące przypadki degradacji i korozji elektrod platynowych, prowadzące do uwalniania tego metalu do otaczających tkanek. Mimo że mechanizmy prowadzące do uwalniania platyny nie zostały jeszcze w pełni poznane, liczne badania z wykorzystaniem zaawansowanych technik analitycznych potwierdziły obecność zarówno rozpuszczalnych form platyny, jak i jej nierozpuszczalnych produktów korozji. Zjawisko to wskazuje na potrzebę dalszej weryfikacji długoterminowej stabilności i bezpieczeństwa stosowania nawet tych materiałów, które dotychczas były uznawane za biologicznie obojętne [127–129].

W kontekście dynamicznego rozwoju materiałów stosowanych w aplikacjach biologicznych i medycznych oraz rosnących potrzeb w zakresie dokładnej oceny ich wpływu na układ biologiczny istotne staje się opracowywanie nowych, szybkich i czułych metod analitycznych służących do oceny biokompatybilności. Obecnie dostępnych jest wiele metod nieklinicznych i klinicznych, takich jak testy *in vitro*, *in vivo*, badania histopatologiczne, testy uwalniania jonów czy testy skórne nadwrażliwości, niemniej jednak każda z nich ma swoje ograniczenia – od wysokich kosztów, przez długi czas realizacji, po trudności w jednoznacznym przypisaniu obserwowanych reakcji biologicznych do konkretnego materiału lub mechanizmu. Z tego względu zasadnym jest poszukiwanie alternatywnych podejść, które umożliwią efektywne, małoinwazyjne i ilościowe monitorowanie wpływu materiałów na komórki.

Jednym z takich rozwiązań może być technika impedancyjna ECIS. W badaniach własnych autora wykorzystano ją do wstępnej oceny przydatności w analizie biokompatybilności cienkowarstwowych elektrod metalicznych. Jak wspomniano wcześniej, do testów wybrano metale o różnym stopniu

reaktywności biologicznej [61, 62]: toksyczną miedź, umiarkowanie reaktywne nikiel [130] i chromonikielinę, a także tytan – uznawany za metal o wysokiej biogodności. Założono, że brak adhezji lub szybkie obumieranie komórek będzie świadczyło o silnej reakcji cytotoksycznej, natomiast rozrost monowarstwy komórkowej umożliwi dalszą analizę ich zachowania w czasie. Wybór powyższych materiałów miał na celu ocenę, czy przy zastosowaniu metody impedancyjnej będzie można określić wpływ danego materiału na komórki *in vitro*.

Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad weryfikacją metody impedancyjnej jako alternatywnego narzędzia do wstępnej oceny biokompatybilności, które może uzupełniać obecnie stosowane metody biologicznej oceny materiałów [124, 131, 132].

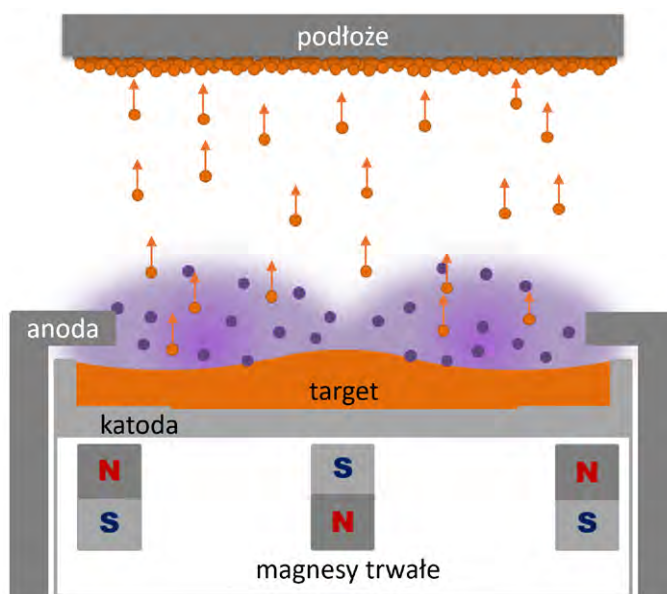
### **3.3. Technologia podłoża pomiarowego z przetwornikami impedancyjnymi**

Osadzanie cienkowarstwowe oraz fotolitografia umożliwiają formowanie elektrod o zróżnicowanej geometrii, dostosowanej do specyficznych potrzeb monitorowania hodowli komórkowych *in vitro*. W badaniach własnych do wytwarzania warstw metalicznych wykorzystano technikę rozpylania magnetronowego. Pozwala ona na kontrolowane nanoszenie jednorodnych warstw materiału o wysokiej czystości i dobrze kontrolowanej grubości. Choć większość wariantów warstw uzyskiwanych techniką rozpylania magnetronowego zaliczana jest do metod fizycznego osadzania z fazy lotnej, to wprowadzenie gazów reaktywnych do procesu pozwala również na prowadzenie reaktywnego rozpylania, stanowiącego połączenie mechanizmów fizycznych i chemicznych [3, 4].

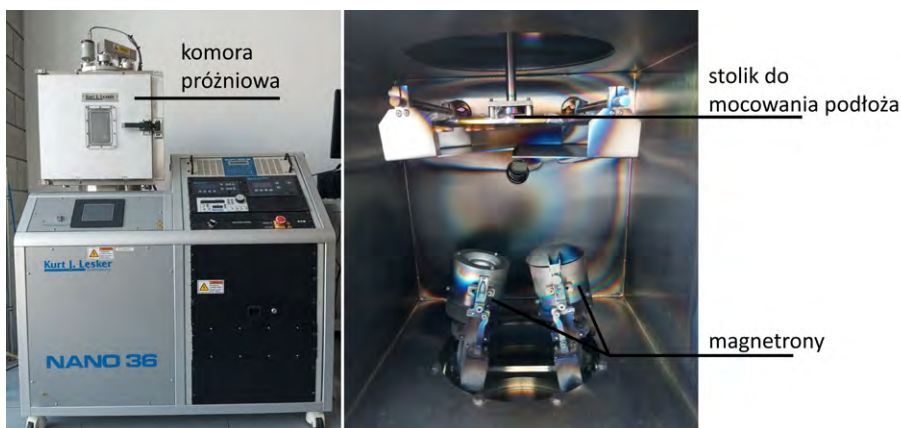
Proces rozpylania odbywa się w komorze próżniowej (ryc. 3.1), w której wytwarza się wysoką próżnię, a następnie wprowadza się gaz obojętny aż do osiągnięcia odpowiedniego ciśnienia roboczego, najczęściej  $10^{-2}$  Tr (1,33 Pa). Do elektrody z targetem przykładana się wysoką polaryzację ujemną, natomiast anodę polaryzuje się dodatnio albo pozostaje ona uziemiona.

W badaniach własnych osadzanie cienkich warstw przeprowadzono przy użyciu urządzenia do rozpylania magnetronowego Nano36 firmy Kurt J. Lesker (ryc. 3.2, tab. 3.1). Komora próżniowa ma kształt sześcianu

o boku 16" (ok. 40 cm). Próżnia w komorze osiągnięta jest przy użyciu dwustopniowego układu pompującego składającego się z pompy wstępnej (olejowa, mechaniczna pompa rotacyjna) oraz pompy wysokiej próżni (pompa turbomolekularna). Zastosowany układ jest w stanie osiągnąć ciśnienie na poziomie  $5 \cdot 10^{-7}$  Tr. Urządzenie zostało wyposażone w zasilacze KJLC 1 kW DC oraz KJLC 300W RF z automatycznym dopasowaniem impedancji. W komorze znajdują się dwa magnetrony, z których jeden pracuje w trybie DC, a drugi – RF (tab. 3.1), umożliwiając wytwarzanie materiałów przewodzących, półprzewodnikowych i dielektrycznych.



**Ryc. 3.1.** Schematyczny przekrój magnetronu z anodą pierścieniową wg rozwiązania firmy Kurt J. Lesker



**Ryc. 3.2.** Urządzenie do rozpylania magnetronowego Nano36 firmy Kurt J. Lesker (z lewej) oraz komora próżniowa z magnetronami (z prawej)

**Tabela 3.1.** Specyfikacja magnetronów napylarki Nano36

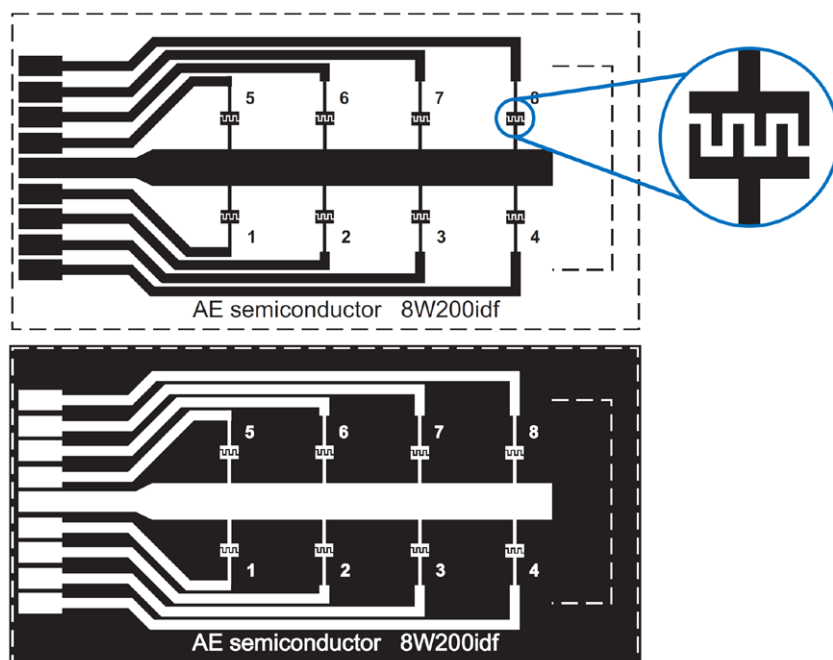
| Parametr                                              | Specyfikacja    |
|-------------------------------------------------------|-----------------|
| Model magnetronu                                      | Torus® 2"       |
| Moc nominalna (DC)                                    | 300 W           |
| Moc nominalna (RF)                                    | 150 W           |
| Ciśnienie robocze                                     | 1 do 50 mTr     |
| Średnica targetu                                      | 2" (50,8 mm)    |
| Maksymalna grubość targetu (materiały niemagnetyczne) | 0,250" (6,3 mm) |
| Maksymalna grubość targetu (materiały magnetyczne)    | 0,125" (3,2 mm) |

Projekt przetworników impedancyjnych opracowano, wzorując się na dostępnych komercyjnie podłożach pomiarowych typu 8W10E+ oraz 8WCP o wymiarach  $76 \times 38 \text{ mm}^2$  produkowanych przez Applied BioPhysics, Inc. (ryc. 2.5). Konstrukcję wyprowadzeń elektrycznych dostosowano do wymagań systemu pomiarowego ECIS Z-Theta.

Zaprojektowano i wytworzono maskę fotolitograficzną zawierającą osiem par elektrod umieszczonych na pojedynczym podłożu. W strukturach kondensatorów grzebieniowych szerokość pojedynczego „palca” elektrody oraz odległość pomiędzy sąsiednimi „palcami” wynosiła  $200 \mu\text{m}$ . W przypadku obecności w pełni jednorodnej monowarstwy komórkowej zastosowane elektrody

pojemnościowe umożliwiają jednoczesne monitorowanie parametrów bioelektrycznych populacji komórek obejmującej średnio od 2000 do 8000 komórek. Przygotowano dwie wersje masek fotolitograficznych, umożliwiające przeprowadzenie procesu fotolitografii zarówno z wykorzystaniem emulsji pozytywowej, jak i negatywowej (ryc. 3.3).

Do wytworzenia matryc pomiarowych zastosowano podłoże z poliwęglanu o grubości 2 mm. Wybór tego materiału był podyktowany jego obojętnością chemiczną względem organizmów żywych, a ponadto uformowane zeń struktury nie ulegały odkształceniom, ugięciom ani nie kumulowały naprężeń wewnętrznych pod wpływem stosowanych obróbek i odczynników.



**Ryc. 3.3.** Projekt masek technologicznych do matryc pomiarowych w wersji pozytywowej (na górze) i negatywowej (na dole)

Kluczowym etapem technologicznym było wytworzenie cienkiej warstwy metalicznej metodą rozpylania magnetronowego z wykorzystaniem urządzenia Nano36. Szczegółowe parametry procesu, dobrane indywidualnie dla każdego z badanych metali (Cu, Ni, Ti, NiCr), zestawiono w tabeli 3.2. Kolejne etapy

wytwarzania struktury elektrod na podłożu poliwęglanowym były identyczne dla wszystkich badanych metali.

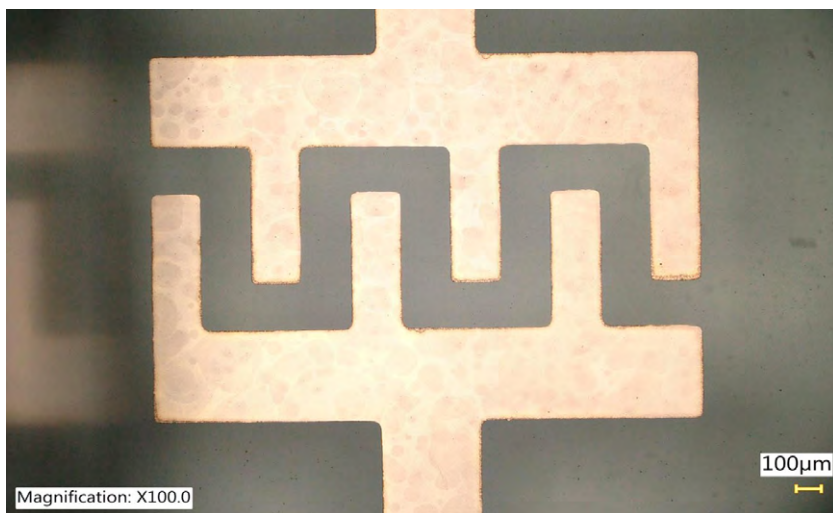
**Tabela 3.2.** Parametry rozpylania magnetronowego dla zastosowanych warstw metali

| Metal | Grubość warstwy [nm] | Moc [W] | Przepływ Ar [sccm] | Czas osadzania [min] |
|-------|----------------------|---------|--------------------|----------------------|
| Cu    | 100                  | 150     | 75                 | 15                   |
| Ni    | 150                  | 100     | 75                 | 200                  |
| NiCr  | 500                  | 200     | 100                | 80                   |
| Ti    | 400                  | 150     | 75                 | 85                   |

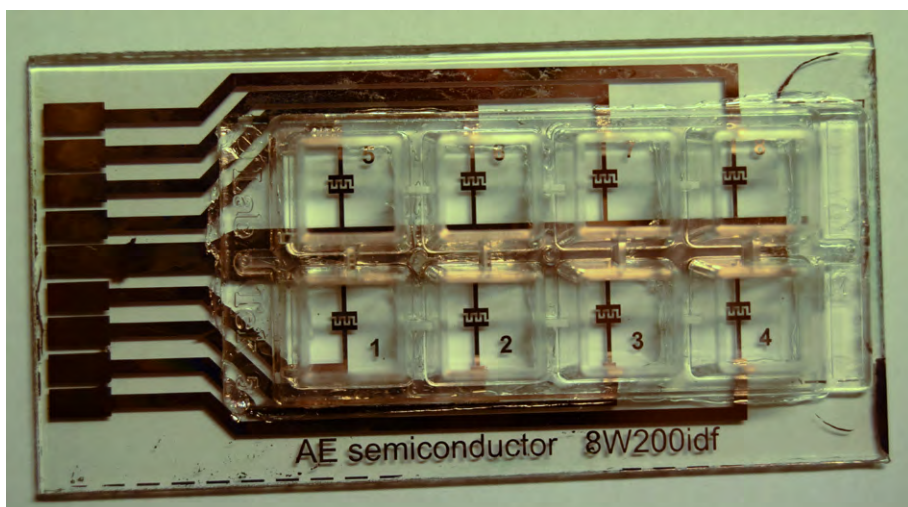
Proces odwzorowania kształtów przy użyciu maski technologicznej przeprowadzono w procesie fotolitografii wykonywanej przy użyciu emulsji światłoczułej Positiv 20. Emulsję wstępnie wygrzano, a następnie naświetlano przez trzy minuty świetłówką UV-A o mocy 20 W. Wzór wytrawiono za pomocą uniwersalnego wywoływacza AGT-087 firmy AG TermoPasty. W trakcie całej sekwencji technologicznej temperatura procesów nie przekraczała 70 °C. Ograniczenie to wynikało z konieczności ochrony podłoża poliwęglanowego przed odkształceniami, niekontrolowaną polimeryzacją lub innymi formami degradacji termicznej, które mogłyby zaburzyć precyzję i powtarzalność wytwarzanej struktury.

W kolejnym etapie przeprowadzono selektywne trawienie nieosłoniętej warstwy metalicznej w procesie trawienia chemicznego przy użyciu kwasów: azotowego ( $\text{HNO}_3$ ), solnego ( $\text{HCl}$ ) oraz ich mieszaniny w stosunku objętościowym 3 : 1 (woda królewska). Po trawieniu podłoża poddano intensywnemu oczyszczaniu w kąpeli ultradźwiękowej z użyciem wody dejonizowanej w celu usunięcia resztek odczynników i produktów reakcji.

Ostatnim etapem montażu było przyklejenie na utworzoną matrycę elektrod wykonanej z przezroczystego polimeru nakładki z ośmioma cylindrycznymi studzienkami hodowlanymi. Połączenie zabezpieczono uszczelnieniem z biokompatybilnego silikonu. W efekcie powstała funkcjonalna matryca pomiarowa, w której dno każdej studzienki stanowi aktywne podłoże z wytrawionymi elektrodami grzebieniowymi (ryc. 3.4). Pojedyncze naczynie charakteryzowało się objętością roboczą 600  $\mu\text{l}$  i powierzchnią hodowlaną 0,8  $\text{cm}^2$  (ryc. 3.5). Gotowe matryce poddano sterylizacji naświetlaniem promieniowaniem ultrafioletowym przez piętnaście minut [133–137].



**Ryc. 3.4.** Kondensator grzebieniowy utworzony w warstwie miedzi na podłożu poliwęglanowym



**Ryc. 3.5.** Matryca wytworzona do pomiaru impedancji komórek z wykorzystaniem poliwęglanowego podłoża o grubości 2 mm zawierająca osiem niezależnych naczyń z elektrodami grzebieniowymi z miedzi

W tabeli 3.3 zestawiono wyniki pomiarów rezystancji przetworników impedancyjnych (wraz ze ścieżkami metalizacji doprowadzającymi do pól kontaktowych), wykonanych po dodaniu pożywki do naczynia hodowlanego. Zaobserwowane różnice między poszczególnymi materiałami metalizacji nie mają charakteru przypadkowego rozrzutu pomiarowego – wynikają przede wszystkim z odmiennych właściwości elektrochemicznych tych materiałów w środowisku pożywki hodowlanej. W przypadku miedzi i tytanu istotną rolę odgrywa degradacja metalizacji w wyniku reakcji z komponentami pożywki (omówiona w dalszej części), co prowadzi do wzrostu rezystancji przetworników. Ponadto kluczowe znaczenie ma proces stabilizacji układu elektroda–pożywka, który wymaga ok. 24 godzin, aby osiągnąć stan równowagi. Różnice między poszczególnymi wariantami Ni (Ni\_1/2 vs. Ni\_3) oraz NiCr (NiCr\_1/2/3 vs. NiCr\_4) można tłumaczyć zróżnicowaną grubością warstw, jakością struktury krystalicznej otrzymanej po procesach osadzania, fotolitografii i trawienia. W związku z powyższym wartość rezystancji nie jest wyłącznie funkcją parametrów geometrycznych ścieżek, lecz wypadkową czynników technologicznych i elektrochemicznych, które należy rozpatrywać łącznie.

**Tabela 3.3.** Rezystancja przetworników impedancyjnych po dodaniu pożywki do naczynia

| Oznaczenie podłoża | Rezystancja [ $\Omega$ ] dla przetworników nr |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                    | 1                                             | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |
| <b>Cu_1</b>        | 1492                                          | 552   | 1186  | 1658  | 722   | 481   | 660   | –     |
| <b>Cu_2</b>        | 1959                                          | 1390  | 1147  | 1746  | 1678  | 1693  | 3437  | 3617  |
| <b>Ni_1</b>        | 707                                           | 873   | 1024  | 1207  | 739   | 989   | 1124  | 1290  |
| <b>Ni_2</b>        | 654                                           | 862   | 1024  | 1252  | 664   | 897   | 965   | 1006  |
| <b>Ni_3</b>        | 12000                                         | –     | –     | –     | 12229 | 16628 | 21371 | –     |
| <b>Ti_1</b>        | 1319                                          | 1892  | 2831  | 10946 | 992   | 1999  | –     | –     |
| <b>Ti_2</b>        | 11405                                         | 15180 | 18557 | 17822 | 9384  | 10163 | 11134 | 13328 |
| <b>Ti_3</b>        | –                                             | 5886  | 8366  | –     | –     | –     | –     | –     |
| <b>NiCr_1</b>      | 1298                                          | 1506  | 1727  | –     | 667   | 1421  | 1648  | 1853  |
| <b>NiCr_2</b>      | –                                             | –     | 1444  | 1666  | 1072  | 1426  | 1749  | 2226  |
| <b>NiCr_3</b>      | –                                             | –     | –     | –     | –     | 1252  | 1473  | 1740  |
| <b>NiCr_4</b>      | –                                             | –     | 3304  | 4627  | –     | 2372  | –     | 3561  |

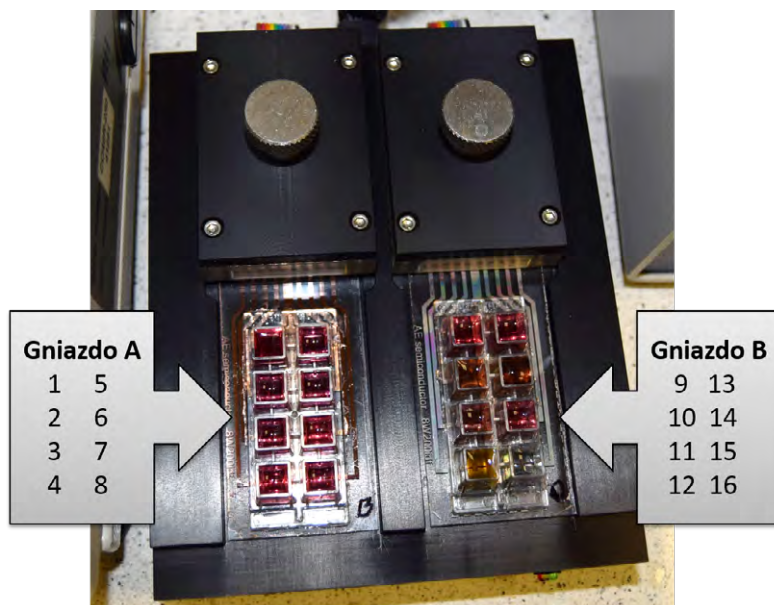
### 3.4. Hodowle komórek w obecności różnych metali

W badaniach własnych do oceny potencjału biologicznego hodowanego na wytworzonych przetwornikach impedancyjnych zastosowano standardowe linie komórkowe mysich fibroblastów L929 oraz małych komórek VERO. Dobór linii komórkowych podyktowany był głównie ich powszechnym stosowaniem oraz możliwościami porównawczymi w przeprowadzonych eksperymentach. Doświadczenia były prowadzone zgodnie z metodologią zalecaną przez producenta linii komórkowych, American Type Culture Collection [138]. Do hodowli użyto opracowanej przez Harry'ego Eagle'a pożywki MEM (ang. Minimal Essential Medium) z 10% płodową surowicą bydlęcą (ang. Fetal Bovine Serum, FBS) inaktywowaną termicznie i antybiotykami (100 IU/ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny, 25 µg/ml amfoterycyny B). Procedury hodowli dla obu typów komórek różniły się jedynie koniecznością użycia trypsyny w przypadku komórek VERO do ich oderwania od ścian naczynia.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono na stanowisku opisanym w rozdziale 2 (ryc. 2.3), a składającym się z systemu pomiarowego ECIS Z-Theta wraz ze stacją bazową, inkubatora Galaxy 170R oraz komputera z aplikacją sterującą odpowiedzialną za zaprogramowanie cykli pomiarowych oraz akwizycję danych.

W pracy przyjęto jednolitą konwencję oznaczania naczyń hodowlanych: te na podłożu umieszczonym w gnieździe A stacji bazowej identyfikowane są numerami 1–8, zaś te na podłożu w gnieździe B – 9–16 (ryc. 3.6).

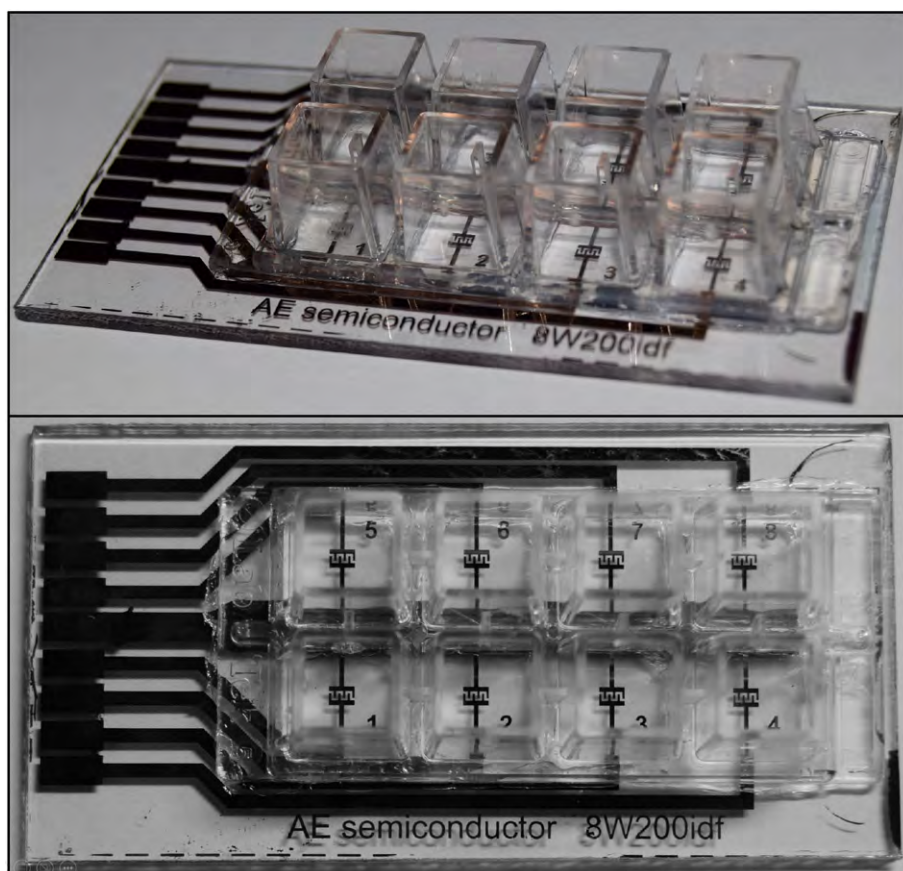
Komórki umieszczane w inkubatorze miały zapewnioną stałą wilgotność, temperaturę 37 °C i poziom nasycenia powietrza 5% CO<sub>2</sub>. Przed rozpoczęciem właściwej hodowli podłoża testowe wraz z samą pożywką zostały umieszczone w inkubatorze na 24 godziny, w celu jej ustabilizowania. Po tym czasie aplikowano do naczyń 600 µl mieszaniny zawierającej 60 µl zawiesiny komórek oraz 540 µl świeżej pożywki, co dawało stosunkowo dużą gęstość wysiewu – ok.  $1,2 \cdot 10^5$  komórek/ml. Gęstość komórek w zawiesinie zwykle zależy od rozpatrywanego problemu badawczego. Przy badaniach adhezji i rozprzestrzeniania się komórki wysiewa się z dużą gęstością, zaś w przypadku monitorowania proliferacji jest ona zwykle mniejsza [139].



**Ryc. 3.6.** Stacja bazowa z umieszczonymi podłożami testowymi wraz z numeracją naczyń hodowlanych w gniazdach A i B

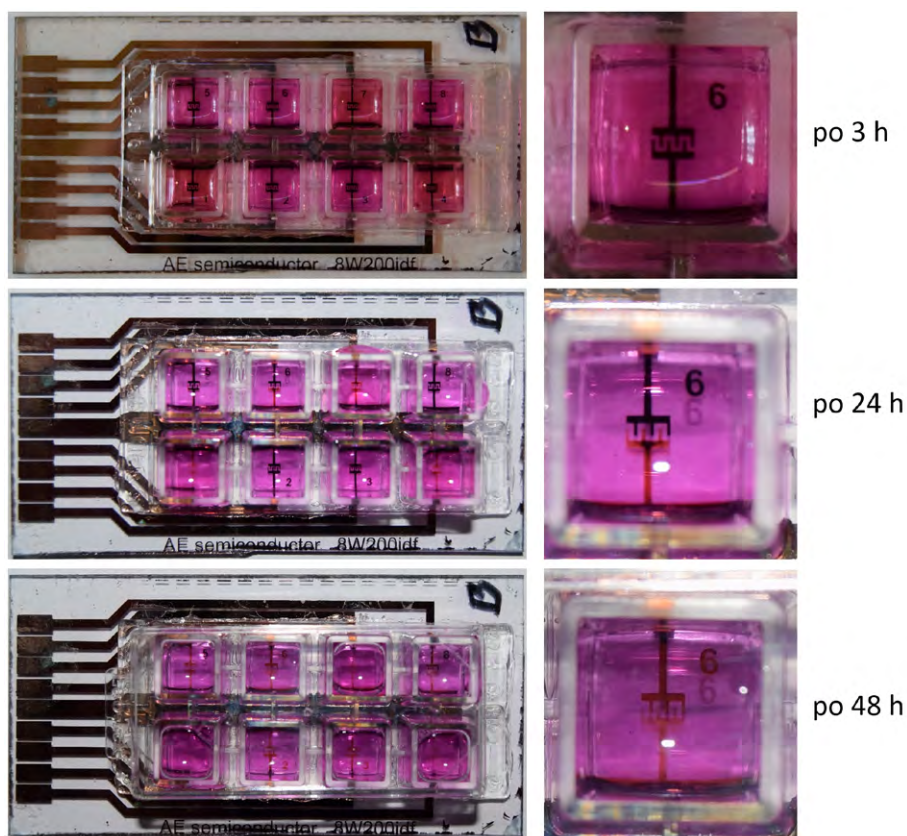
### 3.4.1. Miedziany przetwornik impedancyjny

Ze względu na dobrze opracowaną i stosunkowo prostą technologię obróbki oraz trawienia miedzi do badań wstępnych zostały wykorzystane matryce z elektrodami miedzianymi. Miały one na celu weryfikację poprawności całego procesu technologicznego oraz funkcjonalności stanowiska pomiarowego, zanim przystąpiono do testów z wykorzystaniem pozostałych materiałów (ryc. 3.7).



**Ryc. 3.7.** Podłoże z matrycą z kondensatorów grzebieniowych z miedzi

W pierwszej kolejności zbadano stabilność elektrochemiczną miedzianych elektrod w środowisku pożywki hodowlanej. Po upływie ok. doby zaobserwowano początek procesu korozji w postaci wyraźnego rozpuszczania warstwy metalicznej; natomiast po dwóch dobach ów proces doprowadził do niemal całkowitego usunięcia cienkiej warstwy miedzi z powierzchni podłoża, co wskazuje na jej wysoką niestabilność w warunkach eksperymentalnych (ryc. 3.8).



**Ryc. 3.8.** Podłoże z miedzianymi elektrodami i powiększone naczynie nr 6 po 3 h od dodania pożywki (u góry), po 24 h (zdjęcia środkowe) i po 48 h (na dole) przedstawiające postępujące trawienie miedzi

Rozpoznany wpływ pożywki na warstwę miedzi jest poważnym utrudnieniem i mimo że przetwornik ten wydaje się nieprzydatny w tego typu zastosowaniach, to jednak zdecydowano się na kontynuację badań i przeprowadzenie pełnej hodowli z jego użyciem.

Hodowlę przeprowadzono przy użyciu linii mysich fibroblastów L929 na dwóch podłożach (Cu\_1 oraz Cu\_2) zawierających elektrody z miedzi. Podłoża zostały umieszczone w stacji bazowej w obydwóch gniazdach pomiarowych. Zgodnie z numeracją przedstawioną na rycinie 3.6 w gnieździe A podłoże z kondensatorami oznaczono numerami 1–7 (elektrody kondensatora w naczyniu nr 8 zostały uszkodzone w trakcie procesów technologicznych), zaś w gnieździe B – 9–16.

Wartości dla każdego kondensatora przy danej częstotliwości rejestrowano co dwie minuty, dlatego każdy punkt na krzywej odpowiada rzeczywistemu pomiarowi, a nie wartości interpolowanej. W trakcie eksperymentu, około 15. godziny od jego rozpoczęcia, w gnieździe B wystąpiła przerwa w akwizycji danych spowodowana błędem użytkownika. Pomiar został przywrócony po ok. 5 godzinach, co znajduje odzwierciedlenie w postaci luki w danych. Cały eksperyment zakończono po ok. 42 godzinach. Wyniki pomiarów parametru  $\Delta|Z|$  dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz przedstawiono na rycinach 3.9–3.10.

Po dodaniu pożywki, a przed wprowadzeniem komórek do naczyń hodowlanych, wykonano pomiary impedancji układu ( $Z_0$ ). Na podstawie zmierzonej impedancji system pomiarowy automatycznie wyznaczał odpowiadające jej wartości rezystancji ( $R_0$ ) oraz pojemności ( $C_0$ ), stosując odpowiedni model zastępczy dwójnika elektrycznego. W trakcie trwania hodowli komórkowej rejestrowano kolejne wartości impedancji  $Z(t)$ , z których w analogiczny sposób wyznaczano  $R(t)$  i  $C(t)$ . Następnie dla każdego punktu pomiarowego obliczano zmiany tych wielkości względem wartości początkowych, zgodnie z ogólną zależnością:

$$\Delta X = X(t) - X_0 \quad (3.1)$$

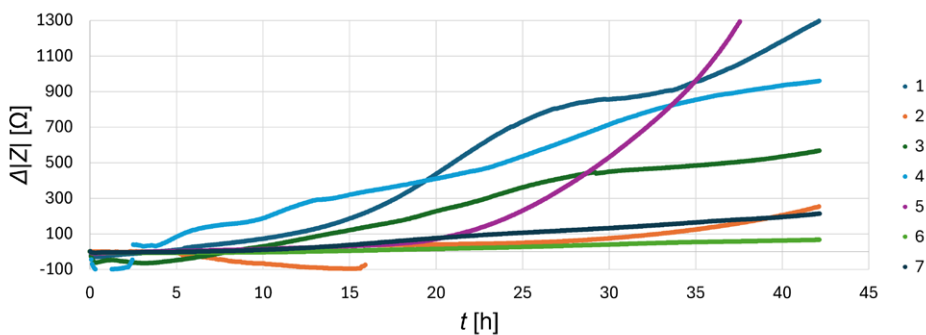
gdzie:

$\Delta X$  – odpowiednio  $\Delta|Z|$ ,  $\Delta R$  lub  $\Delta C$ ,

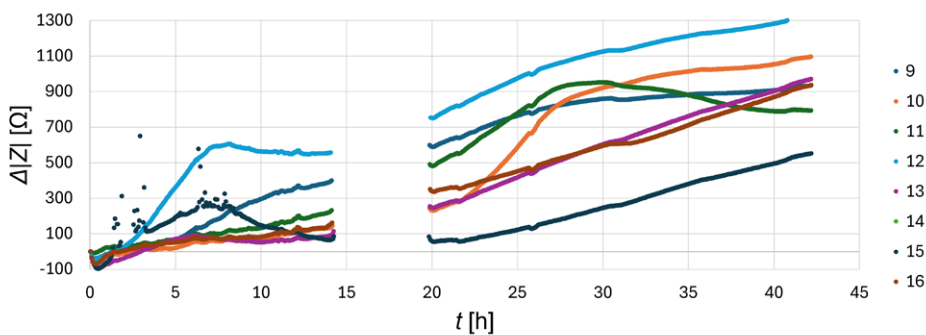
$X(t)$  – wartość danego parametru w chwili  $t$ ,

$X_0$  – wartość danego parametru przed dodaniem komórek.

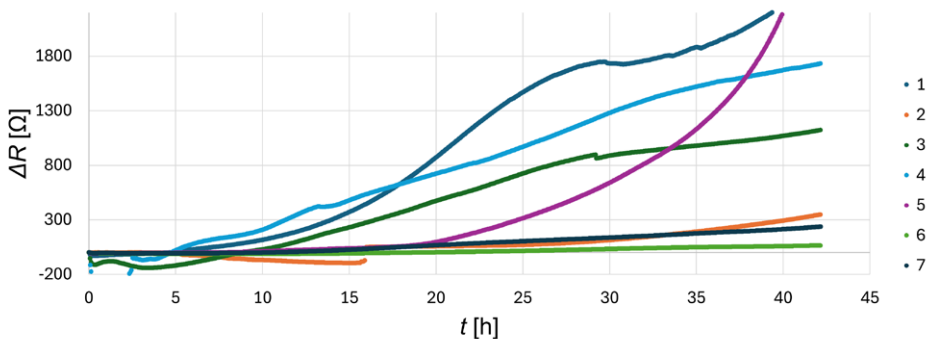
W konsekwencji początkowa wartość każdej z analizowanych krzywych ( $\Delta|Z|$ ,  $\Delta R$ ,  $\Delta C$ ) wynosi zero, natomiast kolejne punkty pomiarowe odzwierciedlają zmiany wartości danego parametru w odniesieniu do stanu początkowego. Umożliwia to jednoznaczne uwidocznienie zmian zachodzących po rozpoczęciu hodowli komórkowej, a także pozwala na porównanie wyników uzyskanych dla poszczególnych naczyń hodowlanych niezależnie od wpływu ich początkowej rezystancji (tab. 3.3). Na rycinach 3.11–3.14 przedstawiono wyniki pomiarów zmian wartości rezystancji oraz pojemności dla obu podłoży testowych, obliczonych w sposób analogiczny do impedancji według wzoru 3.1.



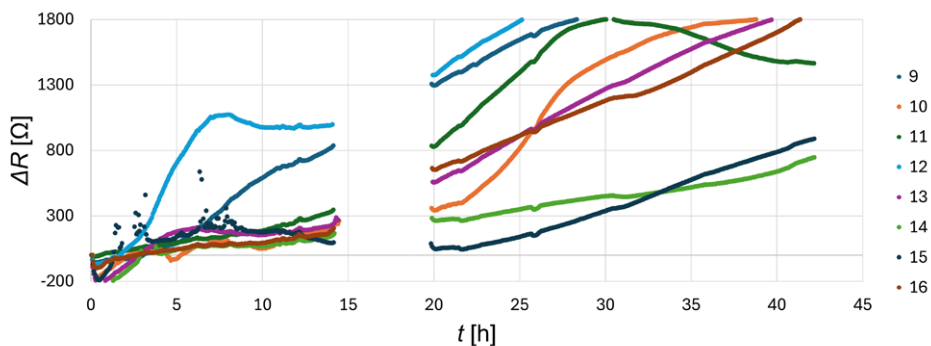
**Ryc. 3.9.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 42 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz na podłożu Cu\_1 w naczyniach 1–7



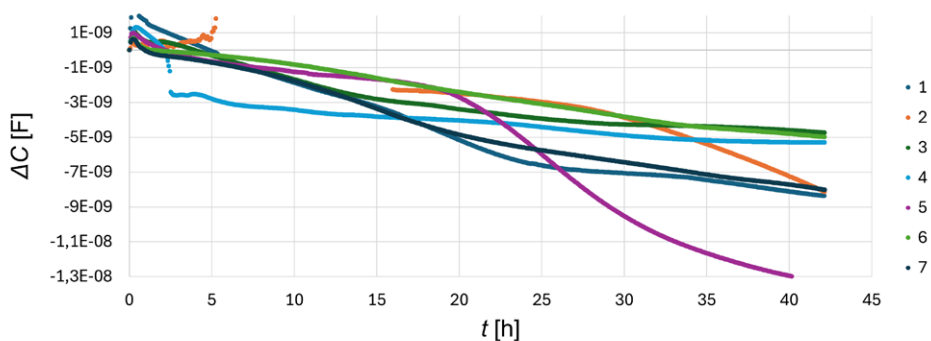
**Ryc. 3.10.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 42 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz na podłożu Cu\_2 w naczyniach 9–16



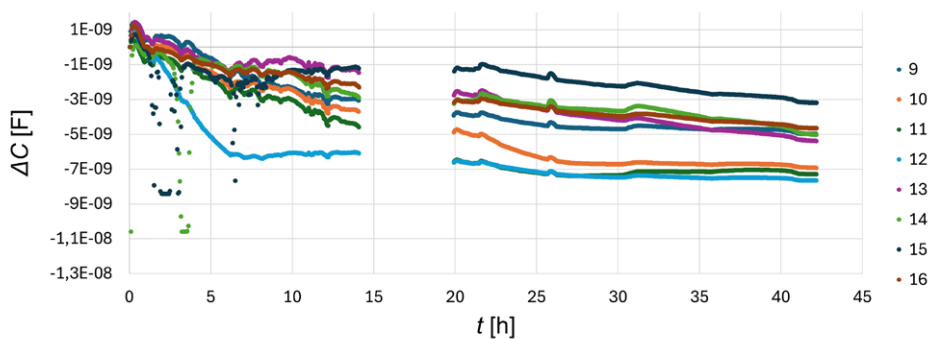
**Ryc. 3.11.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 42 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz na podłożu Cu\_1 w naczyniach 1–7



**Ryc. 3.12.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 42 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz na podłożu Cu<sub>2</sub> w naczyniach 9–16



**Ryc. 3.13.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 42 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz na podłożu Cu<sub>1</sub> w naczyniach 1–7

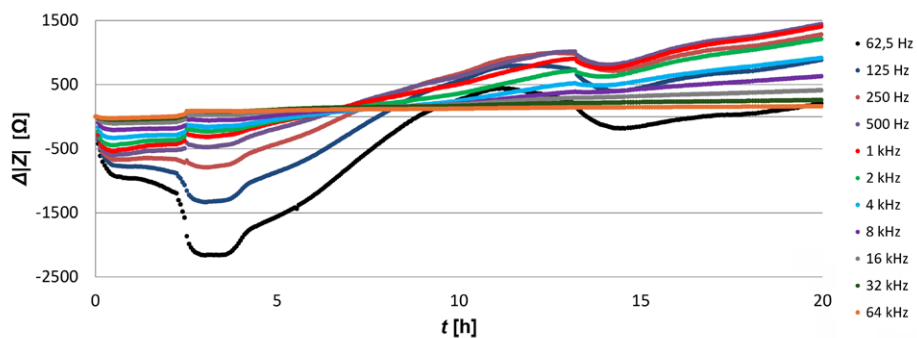


**Ryc. 3.14.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 42 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz na podłożu Cu<sub>2</sub> w naczyniach 9–16

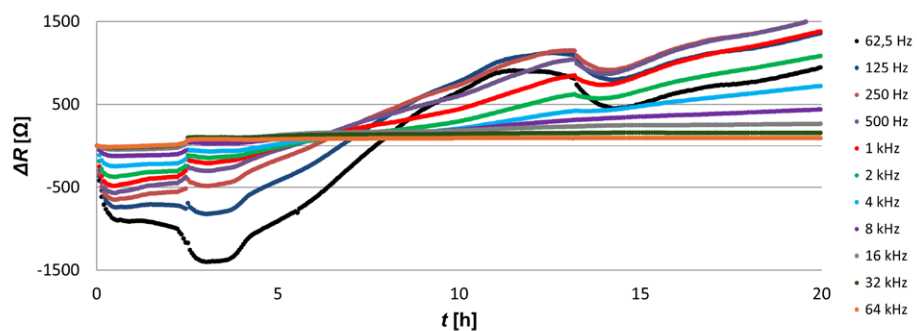
Analiza wyników pomiarów elektrycznych w trakcie hodowli ujawniła systematyczny wzrost wartości rezystancji i impedancji oraz zmianę pojemności. Trend ten wynika głównie z postępującej korozji elektrochemicznej miedzi, obejmującej jej utlenianie i rozpuszczanie w pożywce hodowlanej, co istotnie zakłóca interpretację sygnałów biologicznych w standardowym zakresie częstotliwości.

Aby uwzględnić ten efekt, przeanalizowano dane dla wszystkich zastosowanych częstotliwości sygnału (62,5 Hz–64 kHz). Na rycinach 3.15–3.17 przedstawiono odpowiednio zmiany impedancji, rezystancji i pojemności dla naczynia nr 4 na podłożu Cu\_1. Najistotniejsze zmiany zaobserwowano w początkowych 15 godzinach od dodania komórek do naczynia. Proces adhezji i proliferacji komórek rozpoczął się po upływie ok. 3 godzin, co objawiło się wyraźnym wzrostem impedancji i rezystancji oraz spadkiem pojemności, odzwierciedlając formowanie się monowarstwy. Około 11. godziny widoczna stała się stabilizacja mierzonych wartości, oznaczająca uformowanie się monowarstwy komórek. Natomiast po 14 godzinach odnotowano gwałtowną zmianę trendu – spadek rezystancji i impedancji przy równoczesnym wzroście pojemności. Profil tych zmian jest charakterystyczny dla utraty adhezji komórek i ich obumierania.

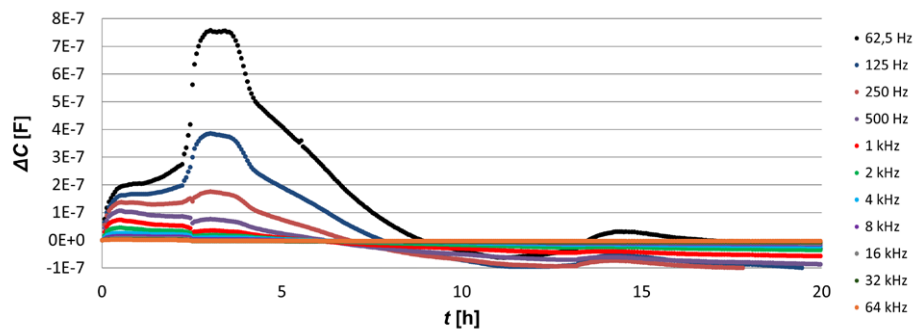
Podobna, choć mniej wyraźna, sytuacja zaszła w naczyniach nr 3 (ryc. 3.18–3.20) i nr 1 (ryc. 3.21–3.23), gdzie dopiero po ok. 10 godzinach rozpoczęło się namnażanie hodowli i tworzenie monowarstwy, co prawdopodobnie było spowodowane obecnością toksycznej miedzi na podłożu. Po tym czasie nastąpił wzrost wartości rezystancji i impedancji oraz spadek wartości pojemności. Po 30. godzinie trwania hodowli jej parametry elektryczne stabilizują się, natomiast następuje powolny, lecz ciągły wzrost mierzonych wartości  $R$  i  $Z$  oraz analogiczny spadek wartości  $C$  – wynik utleniania i rozpuszczania elektrod miedzianych kondensatora grzebieniowego.



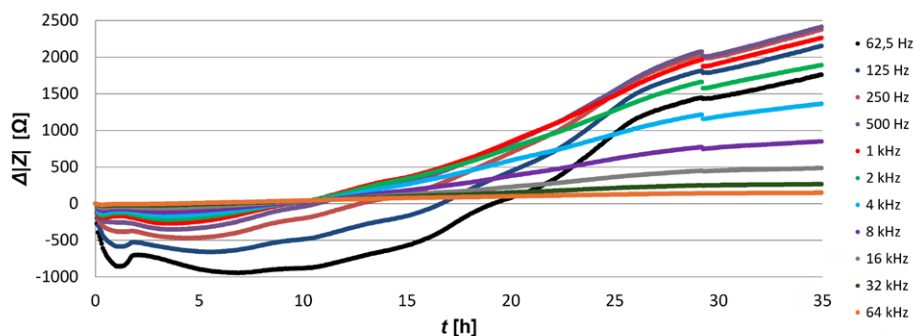
**Ryc. 3.15.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek do 20. godziny w naczyniu numer 4 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



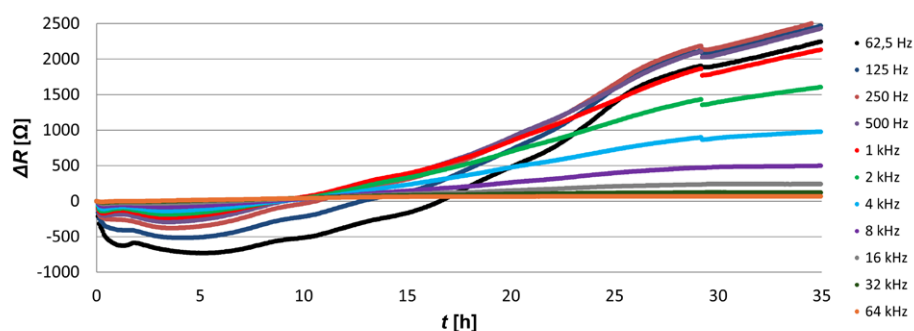
**Ryc. 3.16.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek do 20. godziny w naczyniu numer 4 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



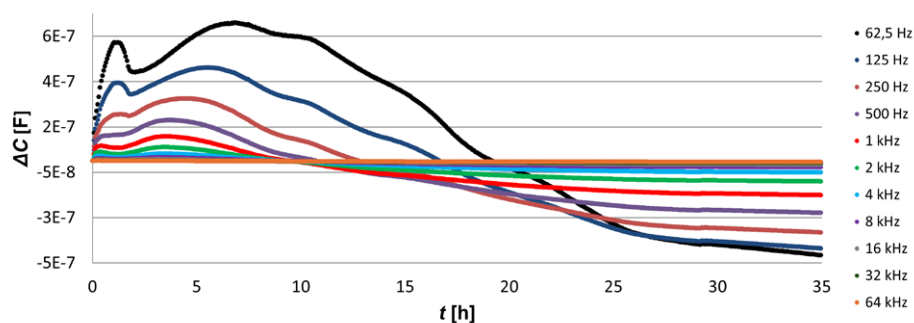
**Ryc. 3.17.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek do 20. godziny w naczyniu numer 4 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



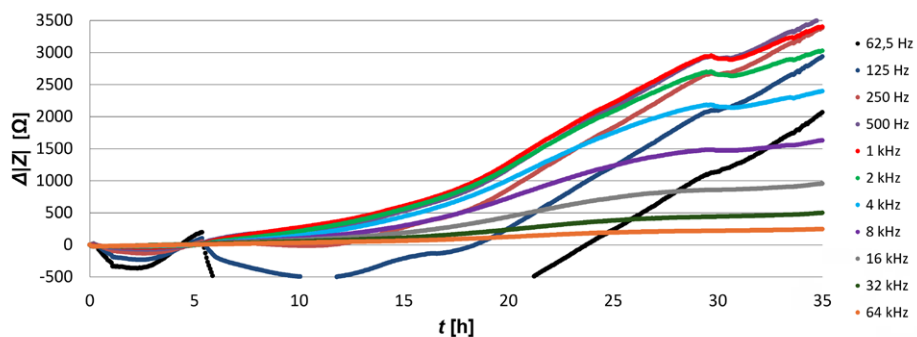
**Ryc. 3.18.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek do 35. godziny w naczyniu numer 3 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



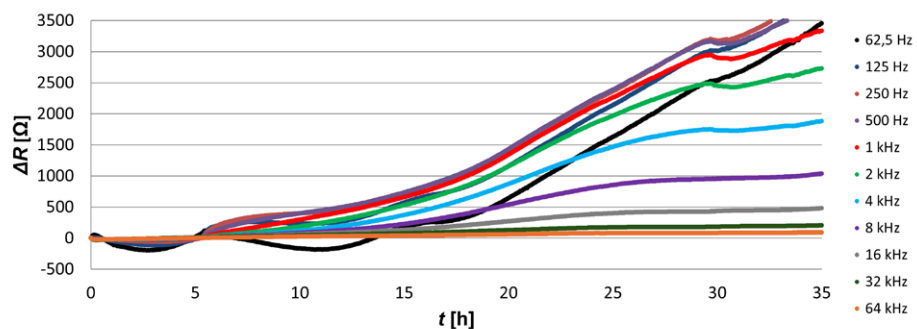
**Ryc. 3.19.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek do 35. godziny w naczyniu numer 3 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



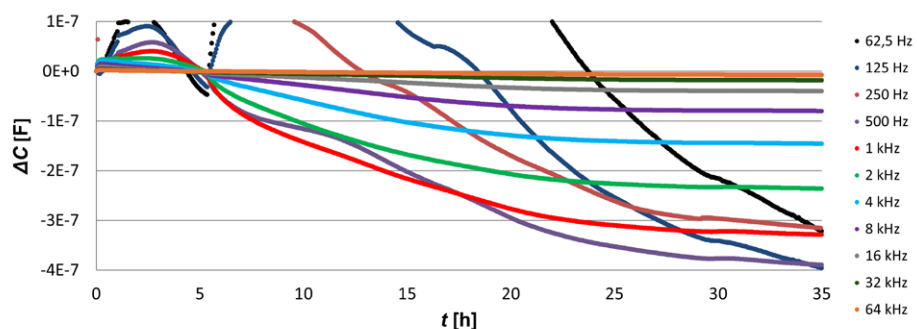
**Ryc. 3.20.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek do 35. godziny w naczyniu numer 3 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



**Ryc. 3.21.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek do 35. godziny w naczyniu numer 1 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



**Ryc. 3.22.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek do 35. godziny w naczyniu numer 1 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału



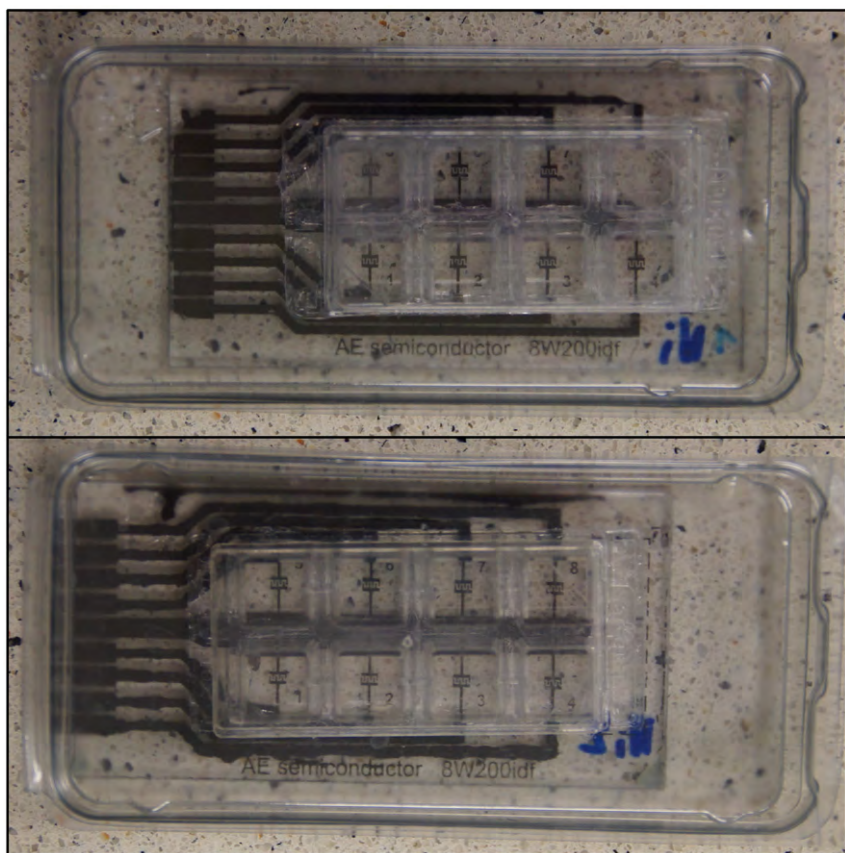
**Ryc. 3.23.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek do 35. godziny w naczyniu numer 1 na podłożu Cu\_1 przy różnych częstotliwościach sygnału

Pomimo uzyskania krzywych o oczekiwanym przebiegu, interpretacja wyników jest dość trudna. W trakcie pomiarów zaobserwowano stopniową degradację elektrod przetwornika. Efekt ten jest wyraźnie widoczny na przedstawionych wykresach. Wskazuje to na fakt, że miedź – mimo swoich korzystnych właściwości fizykochemicznych do wielu aplikacji – nie jest odpowiednim materiałem do zastosowań związanych z pomiarami impedancyjnymi w warunkach hodowli komórkowych. Zgodnie z literaturą nie jest ona uznawana za materiał biokompatybilny, jednak celem przeprowadzonego eksperymentu było wstępne oszacowanie jej przydatności do krótkotrwałych pomiarów powierzchniowych, np. naskórnych. Lepsze zrozumienie wpływu kontaktu miedzi z materiałem biologicznym mogłoby otworzyć możliwość jej zastosowania w konstrukcji urządzeń jednorazowego użytku (np. testy biochemiczne) lub przyrządów przeznaczonych do chwilowego kontaktu z materiałem biologicznym.

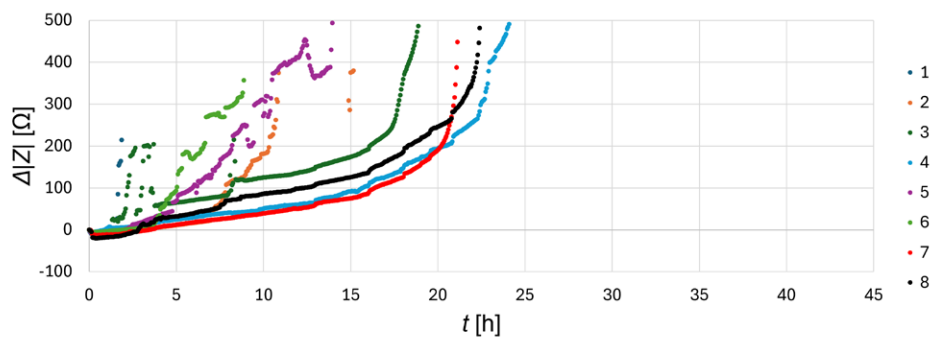
### **3.4.2. Niklowy przetwornik impedancyjny**

Nikiel był szeroko stosowany w budowie różnych cienkowarstwowych układów mikroelektronicznych. Jest używany w różnych rodzajach czujników dzięki swojej dobrej wytrzymałości na wysokie temperatury, odporności na korozję, wysokiemu temperaturowemu współczynnikowi rezystancji i liniowej charakterystyce zależności rezystancji od temperatury. Mimo że wywołuje reakcje alergiczne u 20% populacji, czysty nikiel pełni rolę mikroelementu, dlatego też stanowi interesujący materiał do zastosowań w podobnych aplikacjach.

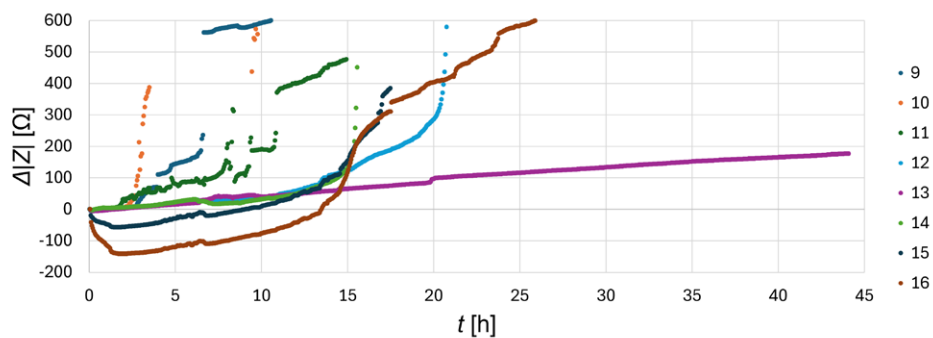
Podczas kolejnego eksperymentu przeprowadzono hodowlę fibroblastów mysich (L929) na podłożach (Ni\_1 oraz Ni\_2) z elektrodami niklowymi (ryc. 3.24), gdzie zmierzono rezystancję, pojemność i impedancję dla częstotliwości sygnału z zakresu 62,5 Hz–64 kHz. Eksperyment trwał ok. 43 godzin. Jednak tylko wyniki uzyskane w ciągu pierwszych kilkunastu godzin pozwalają na interpretację. Po tym czasie nastąpiło uszkodzenie (odklejanie od podłoża) warstwy metalu, pociągające za sobą gwałtowny wzrost rezystancji i impedancji (ryc. 3.25–3.28). Zmiany widoczne są również na wartościach zmierzonej pojemności (ryc. 3.29–3.30). Hodowlę komórkową kontynuowano do ok. 43. godziny, pomimo uzyskania nietypowych rezultatów.



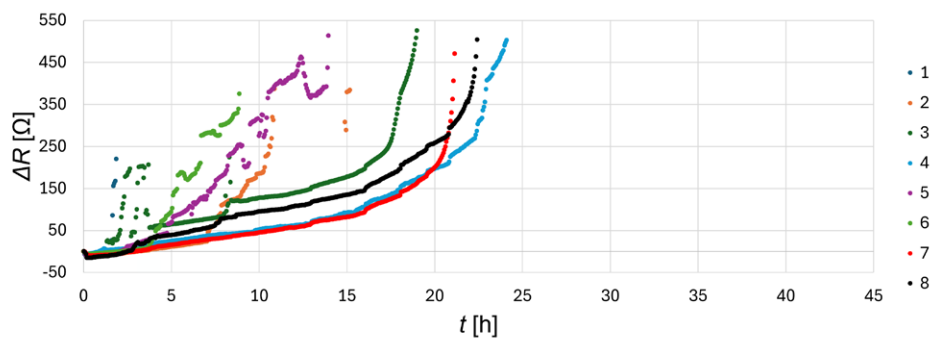
**Ryc. 3.24.** Dwa podłoża testowe z elektrodami grzebieniowymi z niklu



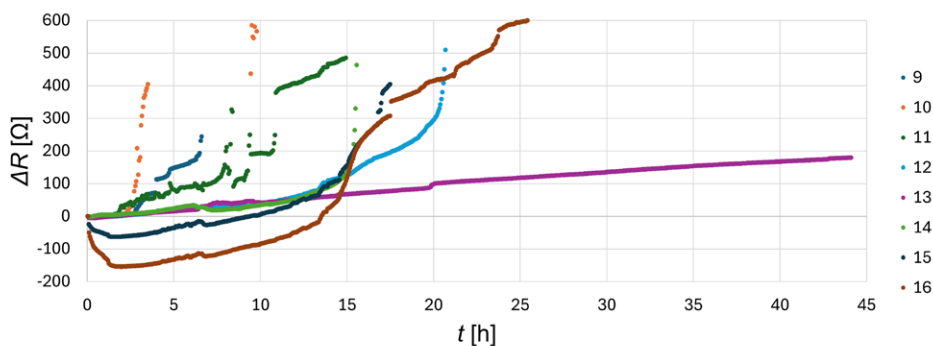
**Ryc. 3.25.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz na podłożu Ni\_1 w naczyniach 1–8



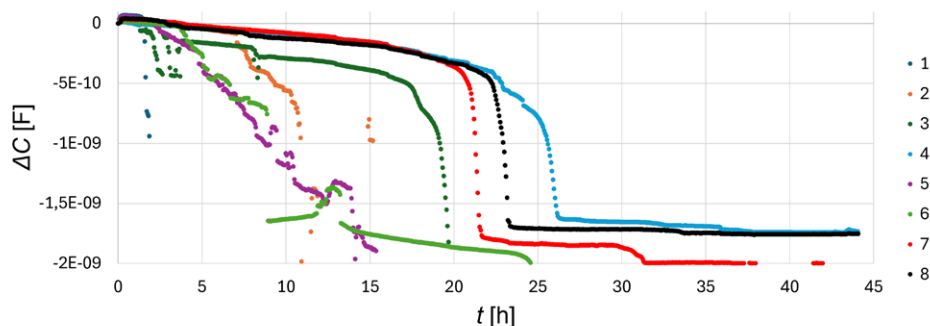
**Ryc. 3.26.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz na podłożu Ni\_2 w naczyniach 9–16



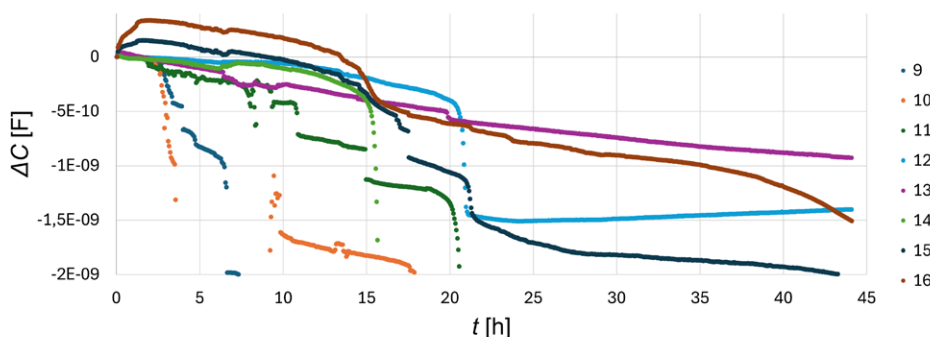
**Ryc. 3.27.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz na podłożu Ni\_1 w naczyniach 1–8



**Ryc. 3.28.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz na podłożu Ni\_2 w naczyniach 9–16



**Ryc. 3.29.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz na podłożu Ni\_1 w naczyniach 1–8



**Ryc. 3.30.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz na podłożu Ni\_2 w naczyniach 9–16

Po zakończeniu hodowli wykonywano zdjęcia mikroskopowe powierzchni elektrod po hodowli komórkowej (ryc. 3.31–3.32). Analiza obrazów ujawniła miejscową utratę adhezji warstwy metalicznej do podłoża polimerowego, co stanowi bezpośrednią przyczynę zaobserwowanego w danych gwałtownego wzrostu rezystancji oraz impedancji. Obszary, na których warstwa niklu uległa całkowitemu oderwaniu, zostały skutecznie skolonizowane przez komórki (ryc. 3.32). Ich wysokie zagęszczenie wskazuje na zachodzące w trakcie eksperymentu procesy proliferacji i migracji. Co istotne, komórki równomiernie rozprzestrzeniły się na całej dostępnej powierzchni dna, obejmując zarówno biokompatybilny poliwęglan, jak i pozostałe fragmenty metalizacji niklowych.

Kluczową obserwacją jest obecność komórek również na zachowanych fragmentach elektrod. Gdyby powierzchnia niklu wykazywała toksyczność lub znacząco hamowała adhezję, komórki byłyby ograniczone wyłącznie do obszarów pozbawionych metalu. Fakt ich obecności na obu typach powierzchni sugeruje, że w warunkach tego eksperymentu nikiel nie działał jako bariera absolutnie cytotoksyczna, pozwalając na przyczepienie i przetrwanie części populacji [137].

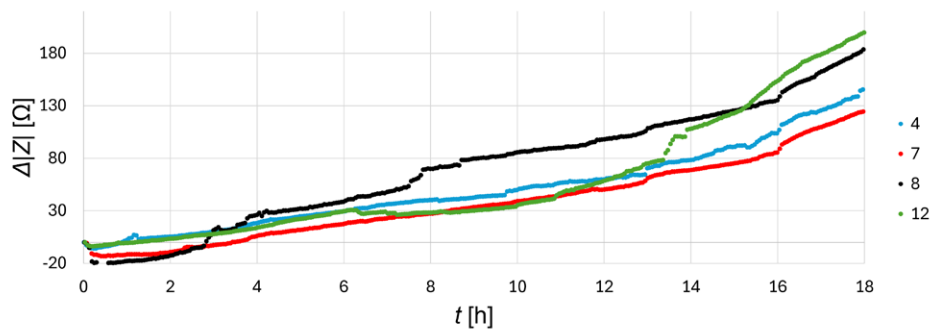
Na rycinie 3.33 przedstawiono zmiany modułu impedancji w czasie określone przy trzech różnych częstotliwościach sygnału AC dla czterech elektrod wykazujących podobny charakter zmian mierzonych parametrów. W ciągu pierwszych 18 godzin hodowli odnotowano wzrost impedancji o około 130–200  $\Omega$ , co wskazuje na dobrą żywotność komórek i ich aktywny potencjał proliferacyjny. Analogiczny trend zaobserwowano dla rezystancji przy  $f = 4$  kHz (ryc. 3.34), która reprezentuje jakość i funkcję bariery komórkowej, toteż uwzględnia rezystancję w kierunku przepływu prądu okołokomórkowego i międzykomórkowego. Przy znacznie wyższej częstotliwości prąd zaczyna przepływać przez komórki ze względu na pojemnościowy charakter błon komórkowych. Jednocześnie w pierwszych 18 godzinach odnotowano wyraźny spadek pojemności (ryc. 3.35). Wraz ze wzrostem rezystancji potwierdza on proliferację i zwiększanie pokrycia powierzchni elektrod przez komórki.



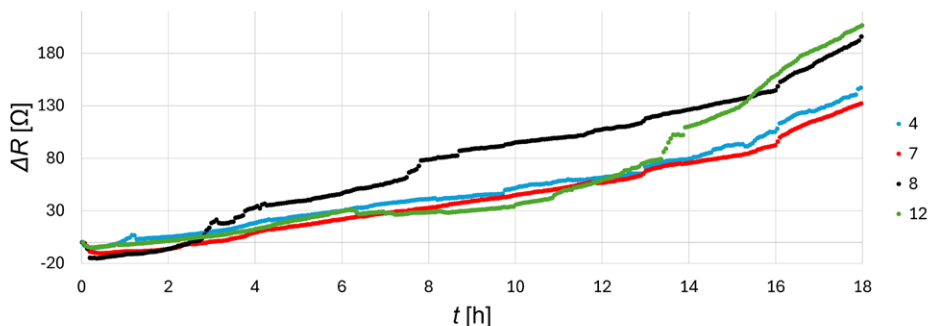
**Ryc. 3.31.** Uszkodzone elektrody kondensatorów niklowych bez komórek w naczyniu referencyjnym po 67 h



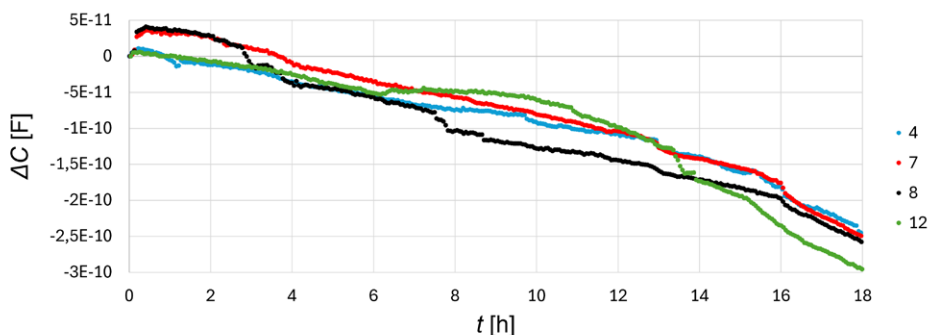
**Ryc. 3.32.** Uszkodzone elektrody kondensatorów niklowych z widocznymi komórkami po 67 h (24-godzinna stabilizacja warunków medium i 43-godzinna hodowla komórek)



**Ryc. 3.33.** Zmiany modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej do 18 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 4, 7, 8, 12 z elektrodami niklowymi



**Ryc. 3.34.** Zmiany rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej do 18 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 4, 7, 8, 12 z elektrodami nikłowymi



**Ryc. 3.35.** Zmiany pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej do 18 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 4, 7, 8, 12 z elektrodami nikłowymi

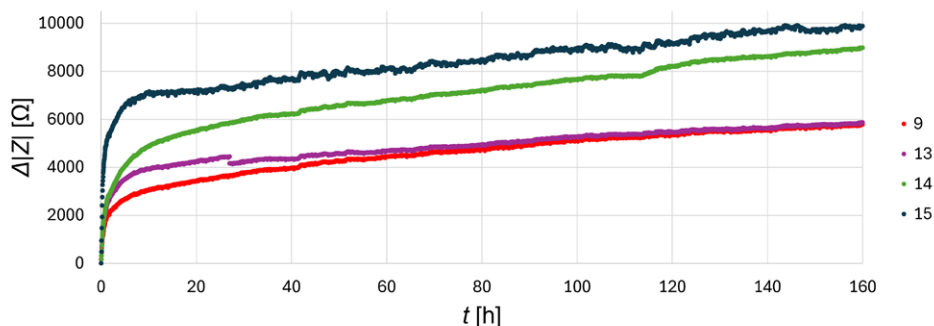
Na tym etapie badań możliwość przeprowadzenia pełnej analizy danych była ograniczona, niemniej jednak uzyskane krzywe zmian impedancji, rezystancji i pojemności w czasie wykazują charakterystyczny profil typowy dla rozwoju hodowli komórkowej *in vitro*, z wyraźnie zaznaczonymi fazami odpowiadającymi adhezji, proliferacji i formowaniu zwartej monowarstwy.

Problemy z adhezją warstwy niklu do podłoża polimerowego mogły wynikać z niedoskonałości procesu trawienia lub niewystarczającego oczyszczenia powierzchni przed osadzaniem metalizacji. W celu weryfikacji tej hipotezy wytworzono nowe podłoże z warstwą niklu, stosując zaostrożony protokół jego czyszczenia przed osadzaniem metalizacji. Podłoże to wykorzystano do

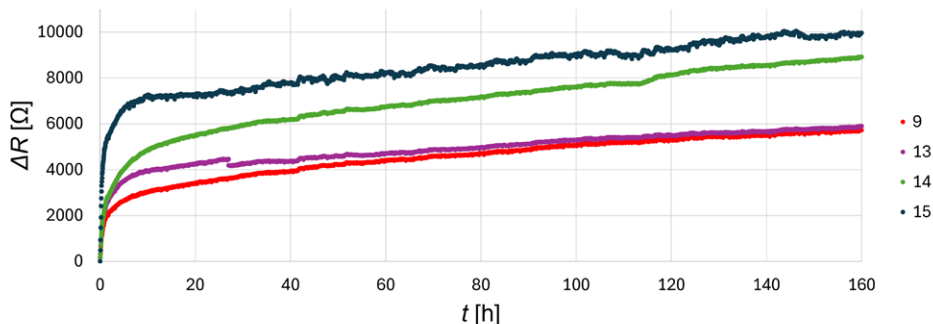
długoterminowej hodowli (ponad 160 godzin) z komórkami linii VERO. W tym przypadku nie zaobserwowano odseparowania się warstwy metalicznej.

Po podłączeniu podłoża do układu pomiarowego ECIS Z-Theta dane z czterech naczyń (ryc. 3.36–3.38) wskazywały na ciągły rozwój hodowli. Analiza wykazała, że w trakcie hodowli komórki pozostawały w fazie aktywnego wzrostu – nie zaobserwowano sygnatur zakończenia cyklu. Zmiany parametrów elektrycznych miały oczekiwany, komplementarny charakter: wzrostowi rezystancji towarzyszył spadek pojemności. Odnotowywane fluktuacje ich wartości odzwierciedlają dynamiczne procesy proliferacji i migracji komórek na powierzchni elektrod, co jest typowym zachowaniem komórek w warunkach sprzyjających wzrostowi.

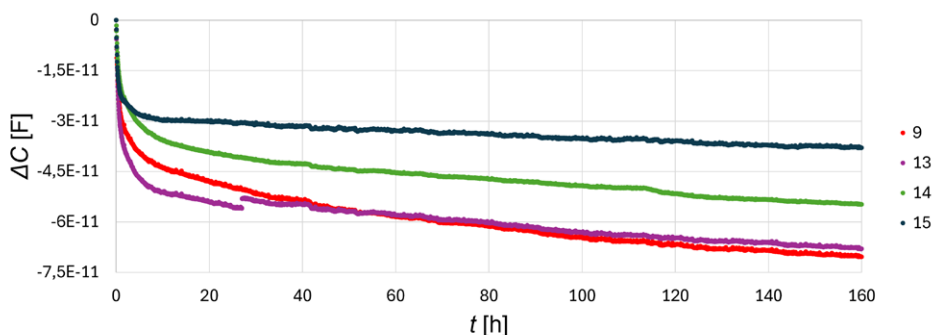
Obrazowanie mikroskopowe hodowli (ryc. 3.39) po zakończeniu pomiarów wykazało, że komórki linii VERO utworzyły na całej dostępnej powierzchni dna w pełni zwartą i jednorodną monowarstwę, pokrywającą zarówno podłoże poliwęglanowe, jak i warstwę metalizacji niklowej. Na obrazach nie zaobserwowano śladów zahamowania proliferacji ani zmian morfologicznych świadczących o toksycznym oddziaływaniu podłoża. Dowodzi to tego, że po odpowiednim przygotowaniu powierzchnia niklu nie wykazuje działania cytotoksycznego w warunkach prowadzonej hodowli i umożliwia prawidłową adhezję oraz proliferację komórek. Tym samym – mimo wcześniejszych trudności technologicznych związanych z adhezją warstwy metalicznej w pierwszej serii podłoży – odpowiednio przygotowane elektrody niklowe okazały się funkcjonalne i nie hamowały wzrostu hodowli.



**Ryc. 3.36.** Zmiany modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 167 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 9, 13–15 z elektrodami niklowymi



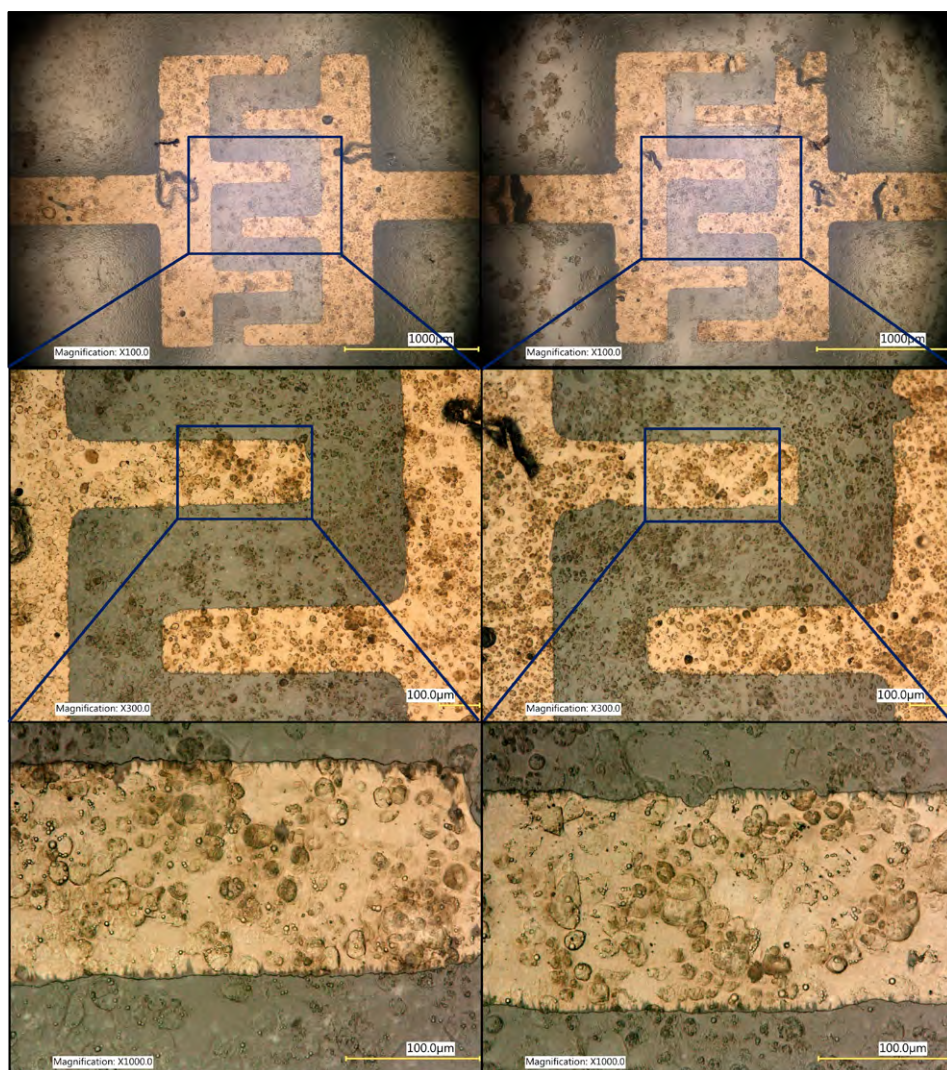
**Ryc. 3.37.** Zmiany rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 167 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 9, 13–15 z elektrodami niklowymi



**Ryc. 3.38.** Zmiany pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 167 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 9, 13–15 z elektrodami niklowymi

Istotnym wyzwaniem dla interpretacji przebiegu zmian parametrów elektrycznych ( $Z$ ,  $R$ ,  $C$ ) w czasie są duże różnice między pomiarami tymi przebiegami wyznaczonymi dla różnych naczyń hodowlanych. Przykładowo po kilku godzinach przyrost rezystancji w naczyniu nr 9 wynosił poniżej 3 kΩ, w naczyniu nr 14 ok. 5 kΩ, podczas gdy w naczyniu nr 15 przekraczał 7,5 kΩ. Podstawową przyczyną tak dużych wartości oraz ich rozrzutu pomiędzy naczyniami może być właśnie niejednorodny wpływ powierzchni niklu na komórki w różnych lokalizacjach matrycy. Pomimo ogólnej biokompatybilności lokalne różnice w morfologii warstwy metalicznej (chropowatość, grubość, czystość powierzchni) lub subtelne różnice w składzie elektrolitu przyelektrodowego mogą wpływać na adhezję,

kształt i szczelność połączeń międzykomórkowych w sposób niejednorodny. To z kolei wpływa na przepływ prądu drogą międzykomórkową, który jest dominującą składową prądu przy niskich częstotliwościach. Nawet biokompatybilny nikiel może zatem jako materiał elektrod wprowadzać dodatkowe źródło zmienności, które utrudnia bezpośrednie porównywanie wyników pomiarów dla różnych naczyń i wymaga krytycznego podejścia do analizy danych eksperymentalnych.



**Ryc. 3.39.** Elektrody niklowe w naczyniach hodowlanych nr 14 (lewa kolumna) i nr 15 (prawa kolumna) po przeprowadzonej hodowli komórek VERO

### 3.4.3. Tytanowy przetwornik impedancyjny

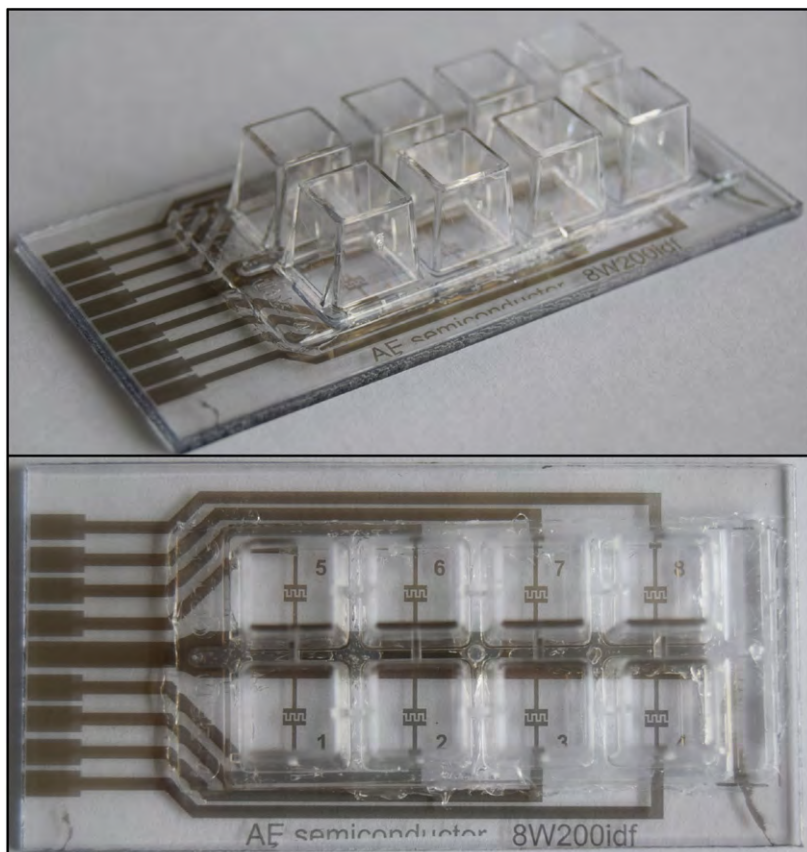
Już od prawie 100 lat tytan uznawany jest za znakomity materiał do zastosowań implantologicznych [140, 141]. Materiał ten wydaje się szczególnie obiecującym kandydatem na elektrody przetwornika impedancyjnego w rozważanych zastosowaniach. Z tego względu podjęto prace badawcze ukierunkowane na jego wykorzystanie.

Elektrody pomiarowe wykonano w warstwie tytanu o grubości 400 nm osadzonego na podłożu poliwęglanowym (ryc. 3.40). Rezystancja początkowa wynosiła od 1,3 k $\Omega$  do ponad 18 k $\Omega$  (tab. 3.3).

Hodowle prowadzono z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych: mysich fibroblastów L929 (na podłożach Ti\_1 oraz Ti\_2) oraz małych komórek nerkowych VERO (na podłożu Ti\_3). Pierwszy eksperyment trwał 72 godziny, a system pomiarowy rejestrował dane w trybie ciągłym. Znaczny rozrzut bezwzględnych wartości rezystancji pomiędzy poszczególnymi naczyniami hodowlanymi (tab. 3.3), w połączeniu z automatyczną skalą zakresów pomiarowych systemu, sprawił, że krzywe zmian obserwowane w trakcie trwania eksperymentu miały niemal liniowy przebieg. Wstępnie mogło to sugerować brak znaczącej aktywności biologicznej.

Analiza danych – polegająca na wykreśleniu zmian parametrów w odniesieniu do ich wartości wyjściowych ( $Z_0$ ,  $R_0$ ,  $C_0$ ) – ujawniła charakterystyczne, nieliniowe trendy, potwierdzając prawidłowy przebieg hodowli w fazach adhezji, proliferacji i formowania monowarstwy.

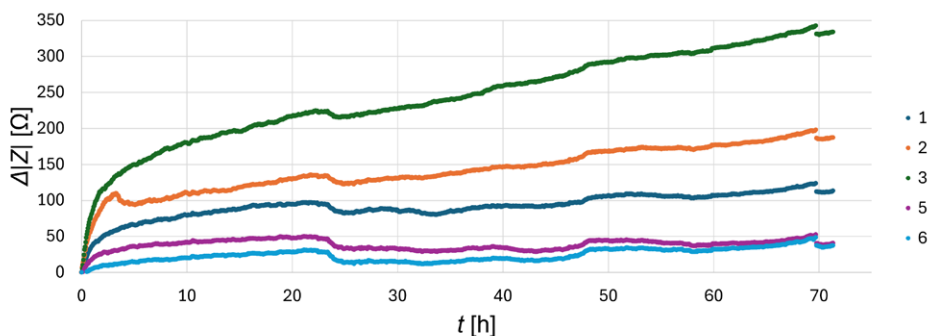
W naczyniach hodowlanych nr 7 i 8 stwierdzono zwarcie ścieżek elektrycznych. Szczegółowa analiza pozostałych naczyń wykazała istotne różnice w dynamice zmian parametrów elektrycznych pomiędzy poszczególnymi naczyniami (ryc. 3.41–3.46). Zaobserwowane rozbieżności przypisano między innymi rozrzutowi geometrii elektrod oraz niedostatecznej czystości powierzchni matrycy, co mogło istotnie wpływać na adhezję i wzrost komórek. Mimo tych różnic ogólny przebieg zmian impedancji i rezystancji w większości naczyń wskazywał na ciągły rozwój hodowli oraz stopniowe zwiększanie pokrycia elektrod przez komórki. Obserwowany komplementarny trend: wzrostowi rezystancji towarzyszył spadek pojemności, który jest charakterystyczny dla proliferacji komórkowej w zastosowanej metodzie ECIS i potwierdza biologiczną aktywność.



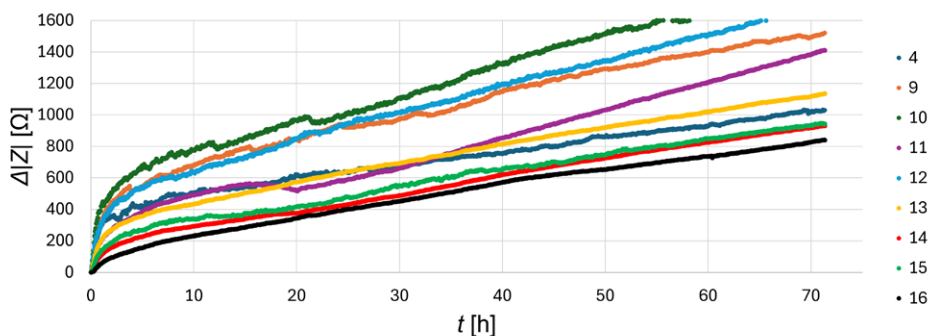
**Ryc. 3.40.** Podłoże testowe z elektrodami tytanowymi

W części naczyń – nr 4, 9–16 – zaobserwowano wyraźny proces degradacji warstwy metalizacji, przypuszczalnie utleniania tytanu do dwutlenku tytanu ( $\text{TiO}_2$ ). Efekt ten jest widoczny na rycinach 3.42 i 3.44, gdzie wartości impedancji i rezystancji wykazują systematyczny wzrost w całym okresie monitorowania hodowli, niezależnie od zmian wynikających z aktywności komórek.

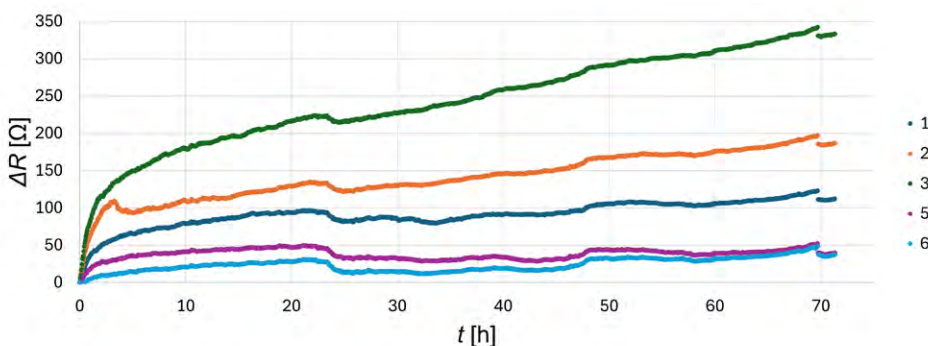
Natomiast w przypadku naczyń o numerach 1–3 oraz 5 i 6 (ryc. 3.41, 3.43 i 3.45) wyniki pomiarów charakteryzują się zbliżonym przebiegiem zmian analizowanych parametrów, mimo że ich wartości bezwzględne różnią się nawet kilkukrotnie. Wskazuje to na zróżnicowaną liczbę komórek przylegających do powierzchni elektrod, co może wynikać z niejednorodnej jakości przygotowania powierzchni podłoża.



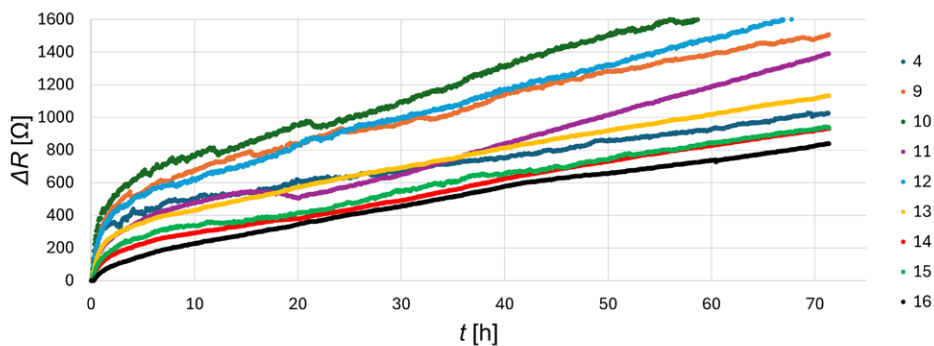
**Ryc. 3.41.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 72 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 1–3, 5, 6 z elektrodami tytanowymi



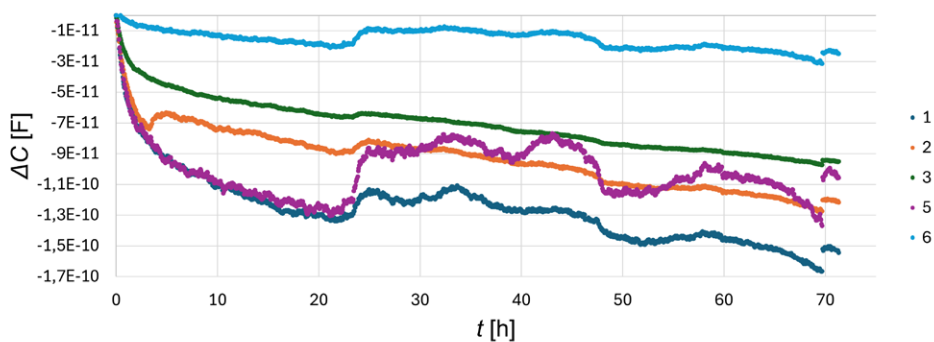
**Ryc. 3.42.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 72 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 4 oraz 9–16 z elektrodami tytanowymi



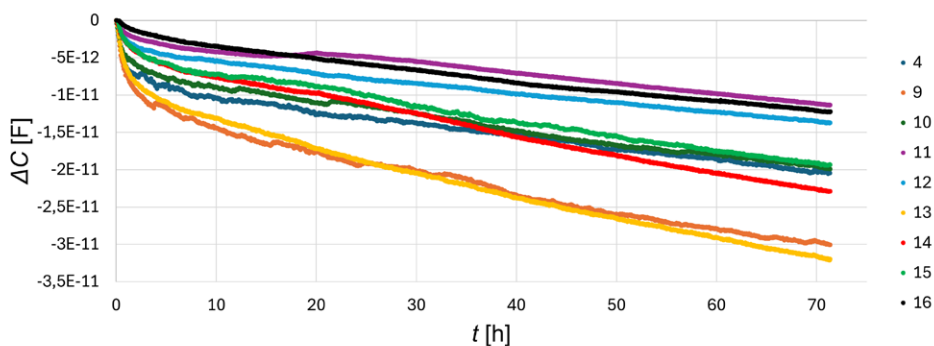
**Ryc. 3.43.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 72 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 1–3, 5, 6 z elektrodami tytanowymi



**Ryc. 3.44.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 72 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 4 oraz 9–16 z elektrodami tytanowymi

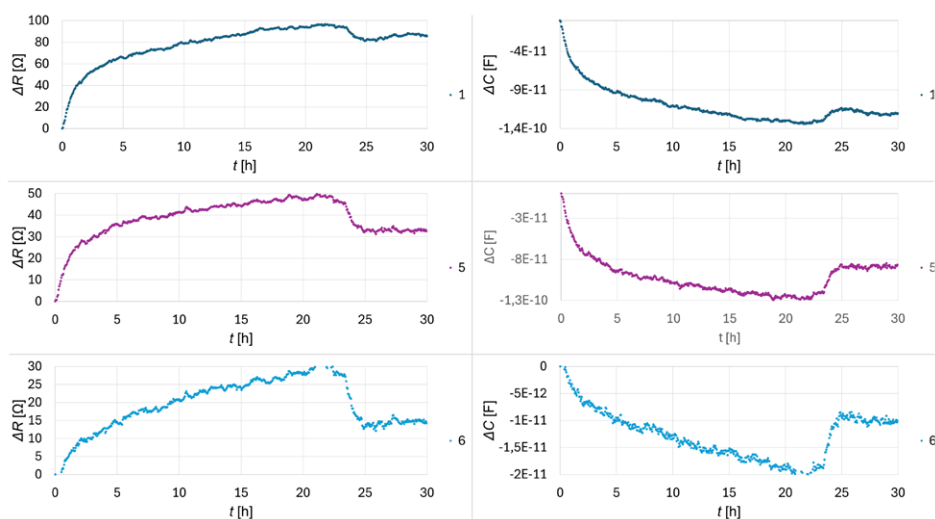


**Ryc. 3.45.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 72 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 1–3, 5, 6 z elektrodami tytanowymi



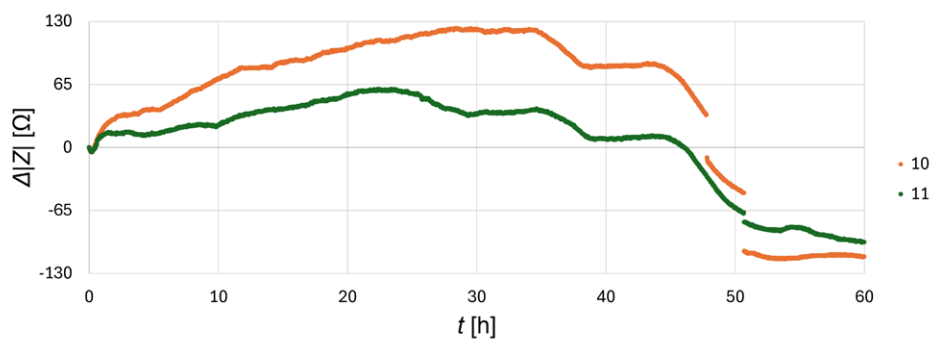
**Ryc. 3.46.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 72 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 4 oraz 9–16 z elektrodami tytanowymi

W przeciwieństwie do hodowli na elektrodach miedzianych i niklowych komórki na tytanie, materiale o wysokiej biogodności, szybko zainicjowały procesy adhezji, proliferacji i formowania monowarstwy. Szczegółowa analiza ujawniła jednak, że ok. 23 godzin po zasiewie w części naczyń nastąpiło obumieranie komórek, widoczne jako przejściowa zmiana parametrów elektrycznych (ryc. 3.47). W większości pozostałych naczyń sygnał ten był trudny do wyodrębnienia, ponieważ nałożył się na niego znacznie silniejszy trend wzrostowy pochodzący najprawdopodobniej od silnego utleniania tytanu.

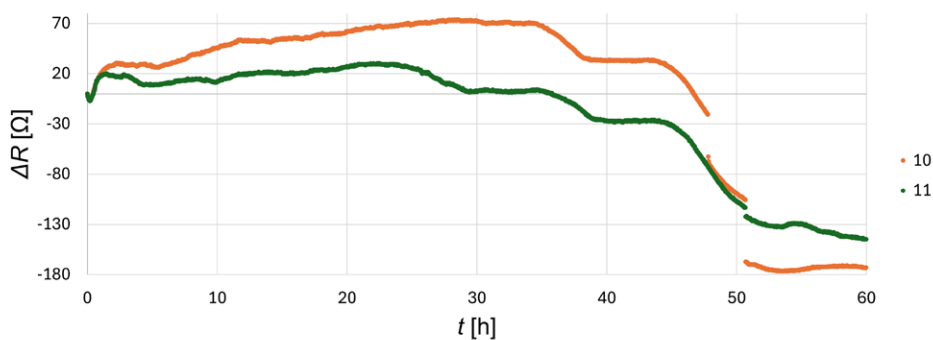


**Ryc. 3.47.** Zmiana rezystancji i pojemności w przypadku badania hodowli komórek do 30 h monitorowania w naczyaniach 1, 5 i 6 z elektrodami tytanowymi

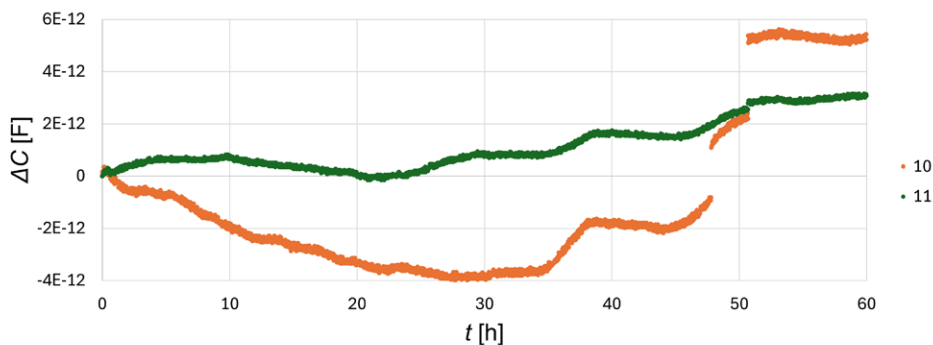
Dodatkowo na podłożu z elektrodami tytanowymi (Ti\_3) przeprowadzono hodowlę komórek linii VERO. Eksperyment przeprowadzono w naczyaniach oznaczonych nr 10 i 11 (podłoże umieszczone w gnieździe B). Zarejestrowane zmiany parametrów elektrycznych wykazywały przebieg typowy dla hodowli komórkowej. Monitorowanie hodowli prowadzono przez ok. 115 godzin, przy czym pełny cykl życia komórek obejmujący adhezję, proliferację, uformowanie i stabilizację monowarstwy został osiągnięty w ciągu pierwszych 51 godzin (ryc. 3.48–3.50).



**Ryc. 3.48.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej 60 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 10 i 11 z elektrodami tytanowymi



**Ryc. 3.49.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej 60 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 10 i 11 z elektrodami tytanowymi



**Ryc. 3.50.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej 60 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 10 i 11 z elektrodami tytanowymi

Przeprowadzone badania wykazały ograniczoną przydatność elektrod tytanowych w pomiarach impedancyjnych. Pomimo potwierdzonej biokompatybilności, która umożliwiała prawidłową adhezję i proliferację komórek, procesy zachodzące w obecności pożywki i pola elektrycznego prowadziły do stopniowej degradacji warstwy tytanu, najprawdopodobniej poprzez jej utlenianie. Proces ten generował silny, narastający w czasie sygnał zakłócający, który nakładał się na zmiany pochodzenia biologicznego. W konsekwencji niestabilność elektrod obniżała wiarygodność i powtarzalność rejestrowanych wyników oraz utrudniała, a w niektórych przypadkach uniemożliwiała, jednoznaczną interpretację dynamiki rozwoju hodowli. Podsumowując, tytan mimo wysokiej biokompatybilności nie spełnia kryteriów optymalnego materiału w tego typu pomiarach.

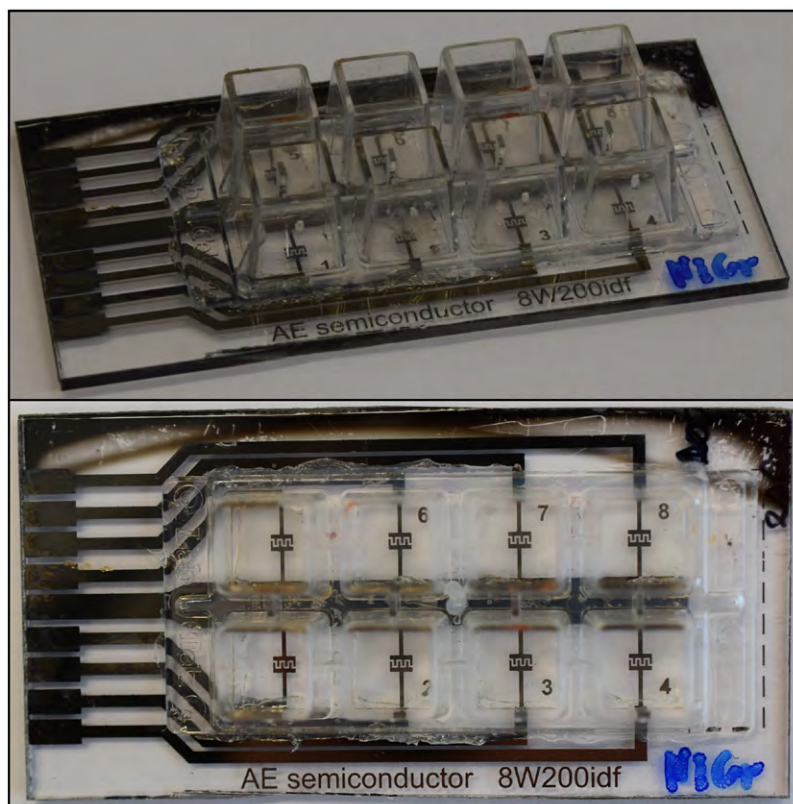
#### **3.4.4. Chromonikielinowy przetwornik impedancyjny**

Do wytworzenia kolejnego zestawu elektrod zastosowano chromonikielinę (NiCr), stop niklu i chromu (80/20% wag.) [142–144]. Materiał ten charakteryzuje się doskonałą stabilnością mechaniczną i odpornością na utlenianie również w temperaturach dochodzących do 1200 °C. Jest stosowany w produkcji narzędzi chirurgicznych oraz biżuterii mającej bezpośredni kontakt ze skórą. Ze względu na dużą rezystywność tego materiału w stosunku do pozostałych metali osadzono warstwę o znacznej grubości 500 nm. Dzięki temu wartości rezystancji ścieżek pomiędzy polem kontaktowym a elektrodami w wytworzonych matrycach pomiarowych (ryc. 3.51) mieściły się w zakresie 667–4627  $\Omega$  (tab. 3.3).

Pierwszą serię eksperymentów przeprowadzono z wykorzystaniem mysich fibroblastów linii L929 na podłożach NiCr\_1 i NiCr\_2. Dla obu matryc zarejestrowano dane z 13 przetworników.

Wyniki uzyskane dla podłoża NiCr\_1 charakteryzowały się znacznym rozrzutem pomiędzy poszczególnymi naczyniami hodowlanymi (ryc. 3.52–3.54). Zaobserwowane zmiany wartości mierzonych parametrów wskazują na adhezję komórek do dna naczyń oraz zachodzącą proliferację, a jednocześnie – z wyjątkiem wyników uzyskanych dla naczyń nr 1, 6 oraz 7, których przebiegi również nie wykazywały wzajemnej zgodności – nie zaobserwowano oczekiwanego

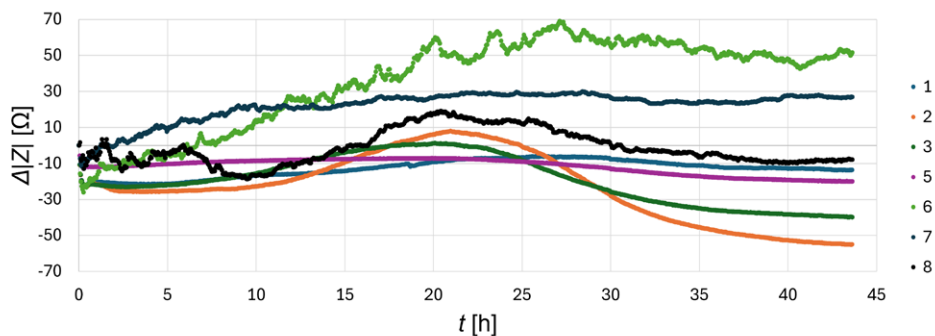
charakteru zmian parametrów elektrycznych, zwłaszcza wzrost pojemności w trakcie hodowli, zamiast oczekiwanego spadku, uniemożliwiał jednoznaczną interpretację biologiczną wyników.



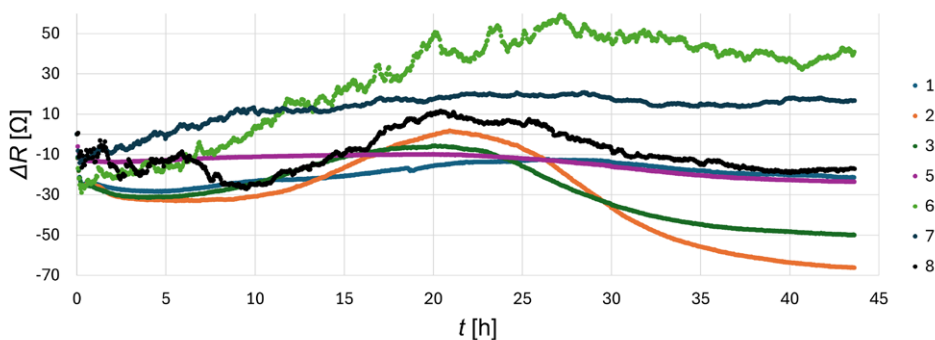
**Ryc. 3.51.** Podłoże testowe z elektrodami z chromonikieliny

Dane z przetworników nr 11–16 na podłożu NiCr<sub>2</sub> (ryc. 3.55–3.57) wykazały pełny, prawidłowy cykl rozwoju hodowli. Charakter zmian impedancji, rezystancji i pojemności był w pełni zgodny z oczekiwanym wzorcem teoretycznym dla metody ECIS. Zmierzone wartości charakteryzowały się wysoką powtarzalnością między naczyniami, świadczącą o jednorodnych warunkach w układzie. Na krzywych wyraźnie zidentyfikowano wszystkie etapy: adhezję, proliferację, utworzenie monowarstwy oraz obumieranie komórek. Obserwacje mikroskopowe wykonane po eksperymencie dla podłoża NiCr<sub>2</sub> (ryc. 3.58) potwierdziły te wnioski, ukazując gęstą, ciągłą monowarstwę komórkową

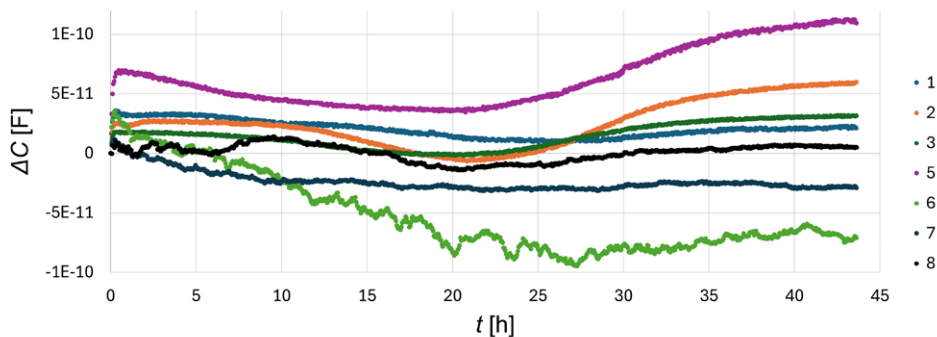
pokrywającą zarówno podłoże polimerowe, jak i elektrody, co wskazuje na wysoką stabilność elektrochemiczną i mechaniczną warstwy NiCr.



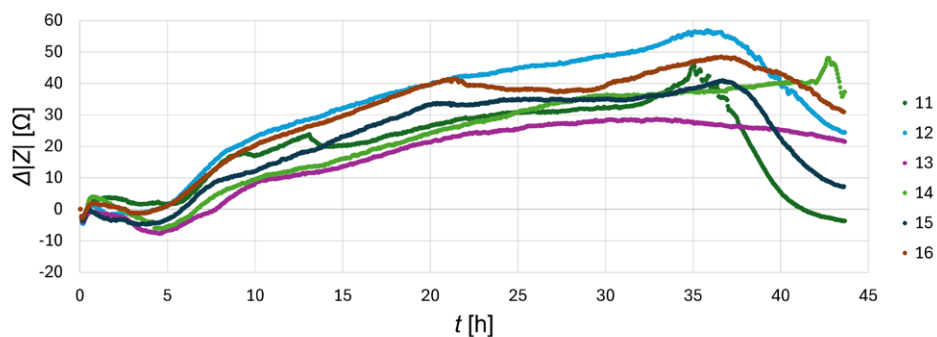
**Ryc. 3.52.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 1–8 z elektrodami z chromonikieliny



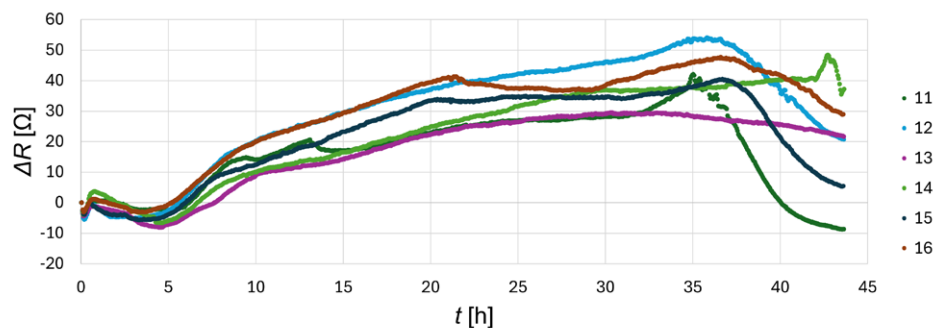
**Ryc. 3.53.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 1–8 z elektrodami z chromonikieliny



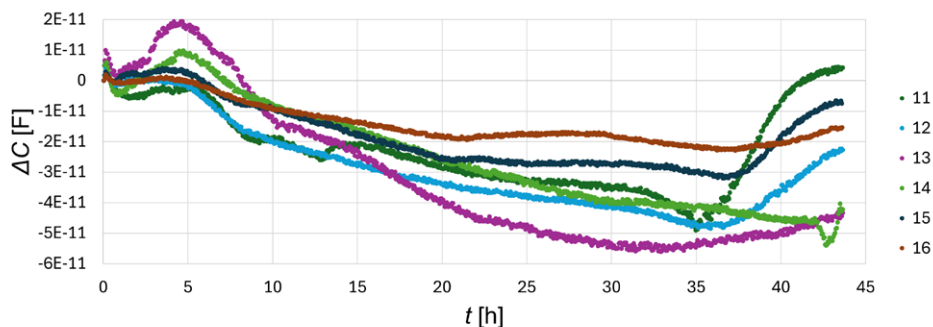
**Ryc. 3.54.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 1–8 z elektrodami z chromonikieliny



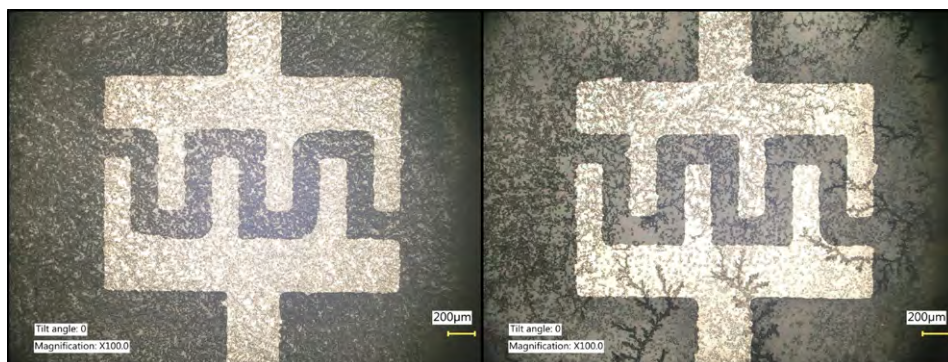
**Ryc. 3.55.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 11–16 z elektrodami z chromonikieliny



**Ryc. 3.56.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 11–16 z elektrodami z chromonikieliny



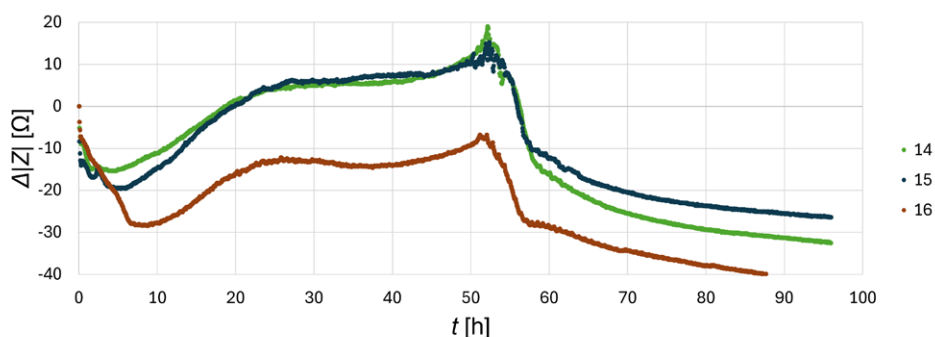
**Ryc. 3.57.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 43 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 11–16 z elektrodami z chromonikieliny



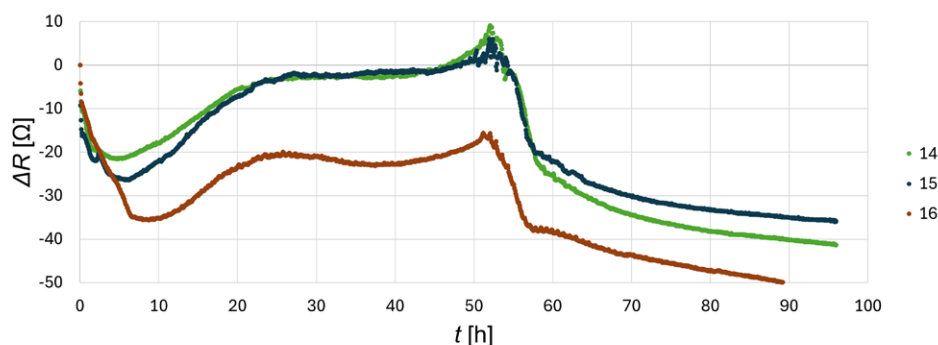
**Ryc. 3.58.** Elektrody z chromonikieliny z monowarstwą komórek po przeprowadzonej hodowli fibroblastów

Przeprowadzono dodatkowe hodowle komórkowe na podłożach z elektrodami z chromonikieliny z użyciem fibroblastów mysich L929 (podłoże NiCr\_3) oraz małpich VERO (NiCr\_4). W eksperymencie z komórkami L929 pełny cykl rozwojowy zakończył się w ciągu ok. 55 godzin. Hodowlę monitorowano ponad 95 godzin (ryc. 3.59–3.61). Wyniki uzyskano z trzech naczyń, nr 14–16. Po trwającym 5–6 godzin okresie opadania i adhezji odnotowano gwałtowny wzrost wartości rezystancji i spadek wartości pojemności, odzwierciedlający intensywną proliferację. Faza wzrostu zakończyła się po 21 godzinach, po czym nastąpiła faza stabilizacji, trwająca do ok. 51. godziny. W kolejnej fazie zaobserwowano kolejną zmianę wartości parametrów, charakterystyczną dla obumierania komórek.

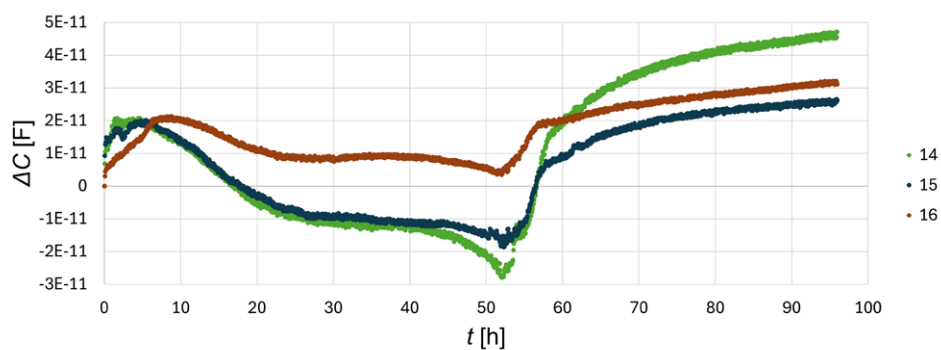
Obrazowanie mikroskopowe potwierdziło te fazy, ujawniając przy tym również istotną niejednorodność: w części naczyń komórki utworzyły ciągłą monowarstwę na całej powierzchni (ryc. 3.62) [145], podczas gdy w innych rozwijały się wyłącznie na metalicznych elektrodach NiCr. Ta druga sytuacja najprawdopodobniej wynikała z niedostatecznego oczyszczenia powierzchni poliwęglanu po procesie technologicznym, co uniemożliwiło prawidłową adhezję komórek do podłoża polimerowego pomimo ich dobrej kondycji na samej metalizacji.



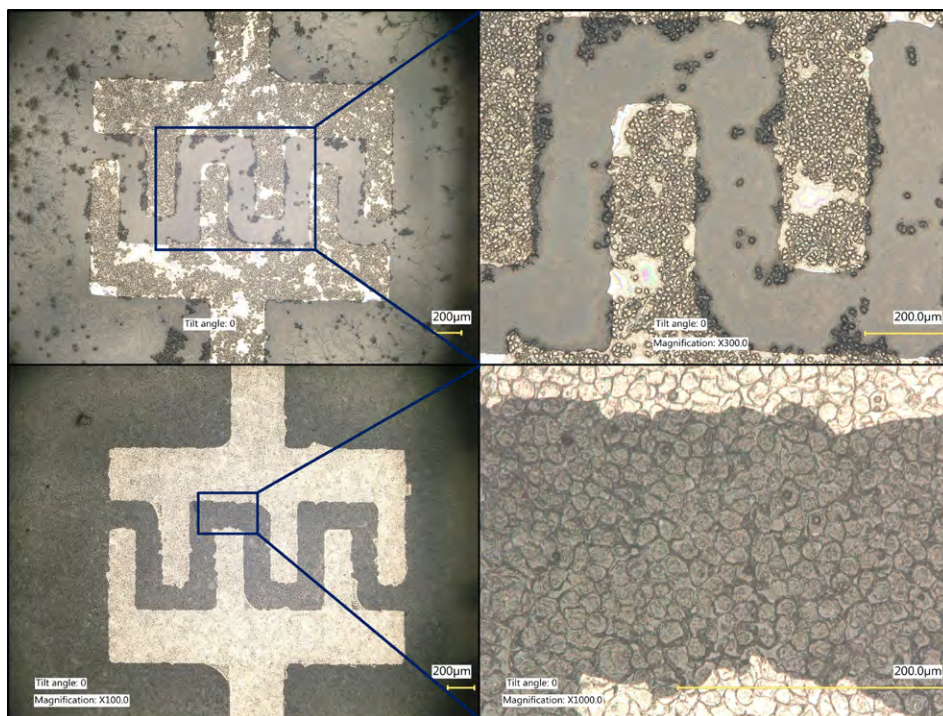
**Ryc. 3.59.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 96 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 14–16 z elektrodami z chromonikieliny



**Ryc. 3.60.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 96 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 14–16 z elektrodami z chromonikieliny



**Ryc. 3.61.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 96 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 14–16 z elektrodami z chromonikieliny



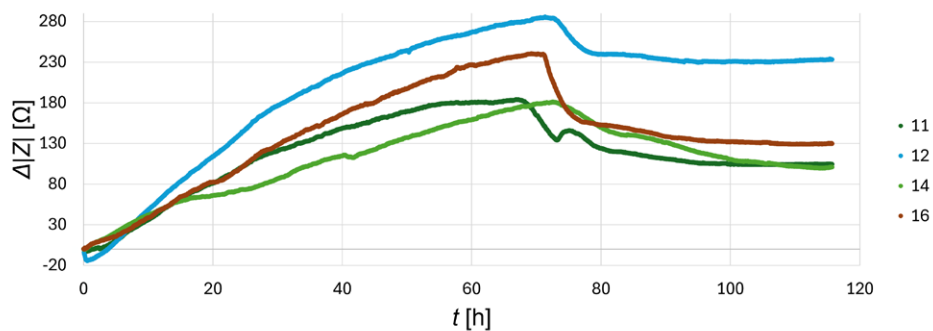
**Ryc. 3.62.** Dna naczyń z komórkami po przeprowadzonej hodowli z elektrodami z chromonikieliny

W eksperymencie przeprowadzonym z wykorzystaniem podłoża NiCr\_4 oraz komórek linii VERO zarejestrowano parametry elektryczne w czterech naczyniach hodowlanych (ryc. 3.63–3.65). Uzyskano wysoką powtarzalność przebiegów zmian wszystkich parametrów elektrycznych w czasie. Potwierdza to jednorodność warunków eksperymentalnych oraz funkcjonalną przydatność warstwy NiCr jako materiału elektrod w pomiarach impedancyjnych.

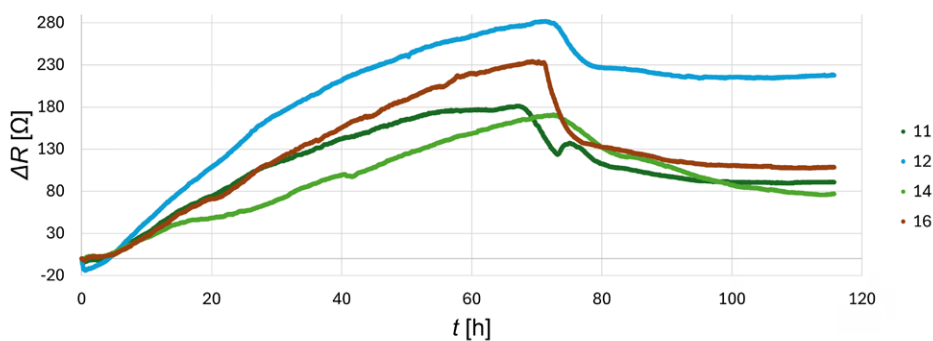
Komórki wykazały szybką adhezję, rozpoczynając intensywną proliferację już w ciągu pierwszej godziny od zasiewu. W przedziale czasowym od 18. do 23. godziny odnotowano niewielkie spowolnienie dynamiki wzrostu monowarstwy komórkowej, co znajduje odzwierciedlenie w przebiegach przedstawionych na wykresach. Około 70. godziny eksperymentu zarejestrowano wyraźne zmiany sygnału. Nastąpił spadek modułu impedancji i rezystancji przy równoczesnym wzroście pojemności – zjawiska charakterystyczne dla rozpoczynającego się procesu obumierania komórek i utraty integralności monowarstwy.

Wyniki uzyskane przy użyciu przetworników z chromonikieliny charakteryzują się wysoką powtarzalnością, co czyni je najbardziej wiarygodnymi spośród wszystkich testowanych materiałów (Cu, Ni, Ti). Na krzywych pomiarowych wyraźnie rozróżnialne są wszystkie kluczowe fazy cyklu życiowego hodowli, w szczególności przejście między stanem uformowanej, pełnej monowarstwy a fazą obumierania komórek. Charakterystycznym sygnałem tego ostatniego etapu jest jednoczesny spadek impedancji i rezystancji oraz wzrost pojemności. Ten komplementarny wzorzec jest bezpośrednim odzwierciedleniem utraty adhezji przez obumarłe komórki i naruszenia integralności barierowej warstwy, co umożliwia ponowne zbliżenie się elektrolitu do powierzchni elektrod.

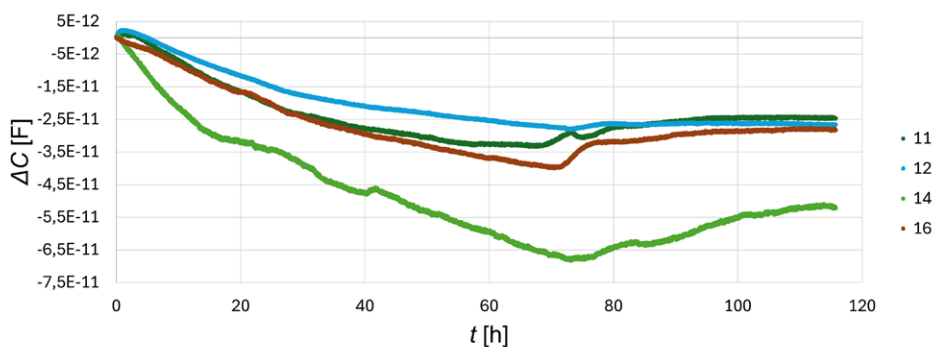
Stabilność elektrochemiczna i dobra biokompatybilność warstw NiCr, potwierdzona w serii eksperymentów z różnymi liniami komórkowymi (L929, VERO), kwalifikuje ją jako funkcjonalną i technologicznie korzystną alternatywę dla elektrod ze złota lub platyny w systemach ECIS. Powtarzalność wyników oraz wyraźne odwzorowanie dynamiki biologicznej wskazują, że układ oparty na elektrodach NiCr może stanowić niezawodne narzędzie do długoterminowego monitorowania żywotności, proliferacji i morfologii komórek *in vitro*.



**Ryc. 3.63.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 115 h dla częstotliwości sygnału  $f = 16$  kHz w naczyniach 11, 12, 14, 16 z elektrodami z chromonikieliny



**Ryc. 3.64.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 115 h dla częstotliwości sygnału  $f = 4$  kHz w naczyniach 11, 12, 14, 16 z elektrodami z chromonikieliny



**Ryc. 3.65.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 115 h dla częstotliwości sygnału  $f = 64$  kHz w naczyniach 11, 12, 14, 16 z elektrodami z chromonikieliny

Wyraźne i jednoznaczne sygnatyry elektryczne kluczowych zdarzeń, takich jak osiągnięcie jednorodnej monowarstwy komórek lub indukcja śmierci komórkowej, otwierają praktyczne możliwości zastosowań detekcyjnych. Platforma ta może służyć jako czuły detektor jakości hodowli do kontroli procesów biotechnologicznych, system wczesnego ostrzegania przed utratą żywotności kultur oraz narzędzie do testowania cytotoksyczności związków chemicznych lub terapeutyków. W tym ostatnim przypadku miarą efektu byłaby dynamika i skala charakterystycznych zmian impedancyjnych związanych z obumieraniem komórek. Podsumowując, platforma pomiarowa z elektrodami NiCr nie tylko spełnia podstawowe wymagania metody ECIS, ale dzięki swojej czułości i powtarzalności stanowi praktyczne narzędzie o potencjale wdrożeniowym w kontroli jakości hodowli oraz zaawansowanych badaniach bioanalitycznych.

### **3.5. Dyskusja wyników**

W przeprowadzonych badaniach oceniono przydatność wybranych materiałów elektrod – miedzi (Cu), tytanu (Ti), niklu (Ni) oraz chromonikieliny (NiCr) – do pomiarów impedancyjnych w hodowlach komórkowych z wykorzystaniem przetworników pojemnościowych. Eksperymenty prowadzono z użyciem dwóch linii komórkowych: mysich fibroblastów L929 oraz małych komórek VERO. W trakcie hodowli rejestrowano zmiany impedancji, rezystancji oraz pojemności w funkcji czasu, wykorzystując system pomiarowy ECIS Z-Theta.

Elektrody miedziane zastosowano celowo, w celu eksperymentalnej weryfikacji doniesień literaturowych dotyczących toksyczności tego materiału. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły nieprzydatność miedzi w tego typu zastosowaniach. Mimo uzyskania w niektórych przypadkach krótkotrwałych sygnałów przypominających biologiczną odpowiedź, dominującym procesem była szybka i postępująca degradacja warstwy metalicznej. Rozpuszczanie miedzi w pożywce hodowlanej prowadziło nie tylko do toksycznego oddziaływania na komórki, ale przede wszystkim generowało silny, niestabilny sygnał zakłócający, który całkowicie uniemożliwiał wiarygodną interpretację danych biologicznych. W konsekwencji elektrody miedziane należy uznać

za nieodpowiednie do długoterminowych pomiarów impedancyjnych w hodowlach komórkowych, choć uzyskany materiał eksperymentalny miał wartość poznawczą.

W przypadku elektrod niklowych zaobserwowano dobrą żywotność oraz proliferację komórek, zwłaszcza po optymalizacji procesu przygotowania podłoża, która wyeliminowała początkowe problemy z adhezją. Umożliwiło to rejestrację sygnałów impedancyjnych związanych z rozwojem hodowli. Jednocześnie stwierdzono istotne różnice w wartościach mierzonych parametrów elektrycznych pomiędzy kolejnymi powtórzeniami eksperymentów, pomimo zachowania identycznych warunków hodowlanych. Ograniczona powtarzalność wyników wskazuje na potencjalne ograniczenia niklu jako materiału elektrodowego w tej metodzie detekcji.

Odmienne od oczekiwań okazały się wyniki uzyskane dla elektrod tytanowych. Pomimo prawidłowego przebiegu procesów biologicznych, obejmujących adhezję, proliferację oraz tworzenie konfluentnej monowarstwy komórek, elektrody tytanowe wykazywały niestabilność materiałową w środowisku wodnym pożywki oraz w obecności pola elektrycznego. Procesy degradacji elektrod skutkowały zakłóceniami mierzonych parametrów, co istotnie ograniczało ich przydatność w długotrwałych pomiarach impedancyjnych. W tego typu zastosowaniach bardziej zasadne wydaje się wykorzystanie nie czystego pierwiastka, lecz jego stopów, analogicznie do rozwiązań stosowanych w medycynie implantacyjnej. Należy jednak podkreślić, że wytwarzanie warstw wieloskładnikowych metodą rozpylania magnetronowego jest technologicznie bardziej wymagające, ponieważ w trakcie procesu materiały tego rodzaju mogą ulegać frakcjonowaniu, co prowadzi do różnic pomiędzy składem chemicznym warstwy osadzonej a składem targetu.

Najbardziej obiecujące rezultaty uzyskano dla elektrod wykonanych z chromonikieliny. Krzywe pomiarowe charakteryzowały się wyjątkową powtarzalnością i zgodnością z teoretycznym modelem odpowiedzi ECIS. Bez zakłóceń rejestrowano wszystkie kluczowe etapy cyklu życiowego komórek: adhezję, proliferację, uformowanie monowarstwy oraz fazę obumierania, sygnalizowaną charakterystycznym, komplementarnym spadkiem impedancji i rezystancji oraz wzrostem pojemności. Stabilność elektrochemiczna, duża biokompatybilność potwierdzona dla obu linii komórkowych oraz korzystne

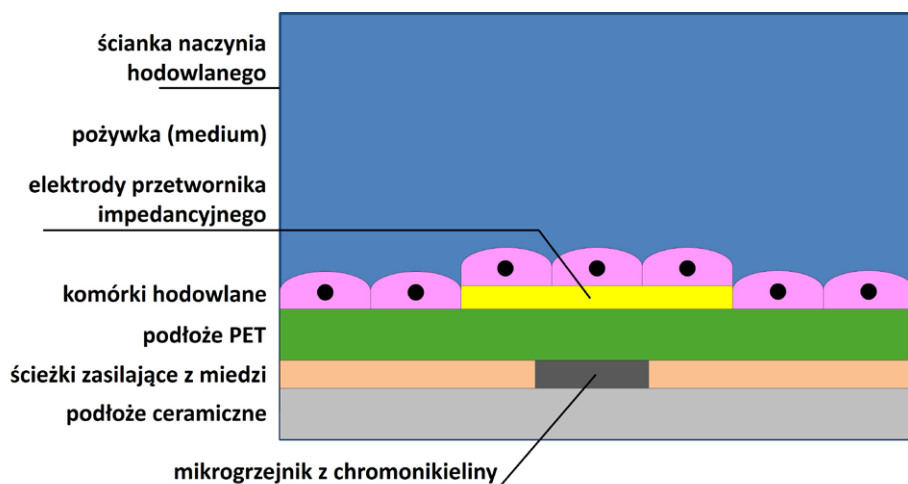
właściwości technologiczne (łatwość trawienia, dobra adhezja do podłoży polimerowych) kwalifikują chromonikielinę jako funkcjonalną i atrakcyjną alternatywę dla powszechnie stosowanych elektrod ze złota lub platyny. Wskazuje to na wysoki potencjał NiCr w zastosowaniach detekcyjnych, takich jak ocena jakości hodowli komórkowych, analiza ich potencjału biologicznego czy wcześnie wykrywanie zmian nekrotycznych.

Podsumowując, powszechnie stosowana w mikroelektronice chromonikielina okazała się szczególnie odpowiednim materiałem do konstrukcji przetworników impedancyjnych przeznaczonych do badań hodowli komórkowych. Przeprowadzone badania potwierdzają prostotę i funkcjonalność takiego rozwiązania, a ponadto korzystne parametry temperaturowe chromonikieliny stwarzają możliwość integracji w ramach jednego układu przetwornika impedancyjnego z mikrogrzejnikiem wykonanym z tego samego materiału. Otwiera to perspektywy dla nowych kierunków badań oraz zastosowań, zwłaszcza w obszarze opracowania impedancyjnych przetworników umożliwiających ocenę potencjału biologicznego komórek odpowiedzialnych za procesy zarażania ran oraz leczenia oparzeń.

## 4. Przetwornik impedancyjny z kontrolą temperatury do hodowli komórkowej

Niniejszy rozdział poświęcono koncepcji oraz badaniom nad połączeniem w jednym układzie pomiarowym dwóch elementów: cienkowarstwowego mikrogrzejnika wykonanego z chromonikieliny oraz przetwornika do impedancyjnego monitorowania hodowli komórkowej (ryc. 4.1). Głównym celem prowadzonych prac było opracowanie metody umożliwiającej prowadzenie eksperymentów *in vitro* w warunkach kontrolowanej temperatury przy jednoczesnym monitorowaniu parametrów elektrycznych charakteryzujących stan biologiczny hodowli komórkowej.

Jak wykazano w rozdziale trzecim, elektrody z chromonikieliny nie zakłócają wzrostu komórek, a technika pomiarowa ECIS pozwala ocenić ich kondycję. Zaproponowany i zrealizowany układ pomiarowy umożliwia jednoczesną obserwację hodowli komórkowych za pomocą pomiaru impedancji układu elektrody-pożywka z komórkami oraz lokalną modulację warunków temperaturowych w obrębie pojedynczych naczyń hodowlanych. Takie rozwiązanie pozwala na realizację eksperymentów zarówno w trybie statycznym – polegającym na długotrwałym podwyższeniu temperatury w skali wielogodzinnej – jak i dynamicznym, obejmującym krótkotrwałe impulsy temperaturowe o czasie trwania rzędu sekund.



**Ryc. 4.1.** Przekrój schematyczny naczynia hodowlanego z układem pomiarowym zawierającym cienkowarstwowy mikrogrzejnik z chromonikieliny oraz przetwornik do impedancyjnego monitorowania hodowli komórkowej

W ramach przeprowadzonych badań zrealizowano dwa warianty eksperymentów odpowiadające różnym celom badawczym. Pierwszy z nich dotyczył oceny możliwości prowadzenia równoległych hodowli komórkowych w zróżnicowanych lokalnych warunkach temperaturowych przy zachowaniu niezależności termicznej pomiędzy poszczególnymi naczyniami hodowlanymi. W tym celu opracowano koncepcję planarnego mikrogrzejnika dołączonego do układu impedancyjnego monitorowania hodowli. Skuteczność lokalnego podgrzewania weryfikowano zarówno na podstawie pomiarów termicznych, jak i z wykorzystaniem symulacji numerycznych.

Drugi wariant badawczy koncentrował się na ocenie przydatności mikrogrzejnika do kontrolowanego wywoływania lokalnych uszkodzeń termicznych w monowarstwie komórek. Celem było opracowanie układu grzejnego umożliwiającego osiągnięcie w niewielkim obszarze dna naczynia hodowlanego temperatury prowadzącej do utraty adhezji komórek i naruszenia ciągłości monowarstwy. Zastosowanie techniki impedancyjnej umożliwiło ocenę procesów uszkodzenia i regeneracji monowarstwy. Funkcjonalność zaproponowanego rozwiązania zweryfikowano w trakcie eksperymentalnych hodowli komórkowych, rejestrując zmiany parametrów elektrycznych, co pozwoliło

na analizę dynamiki odpowiedzi biologicznej komórek na kontrolowane oddziaływanie termiczne.

#### 4.1. Mikrogrzejniki – przegląd rozwiązań

Obecnie stosowane mikrogrzejniki wykorzystują zróżnicowane mechanizmy generowania i kontroli ciepła, w zależności od wymagań konkretnych aplikacji i konstrukcji urządzenia. Kluczowe elementy ich działania obejmują nie tylko efektywną konwersję energii, ale również możliwość dynamicznego i lokalnego kształtowania profilu temperaturowego oraz jego precyzyjnego monitorowania [146–152]. Najczęściej stosowane rozwiązanie polega, zgodnie z prawem Joule’a, na wytwarzaniu ciepła w wyniku przepływu prądu elektrycznego przez rezystor [153, 154]. Alternatywne rozwiązania obejmują ogniwa termoelektryczne (Peltiera), w których przepływ prądu elektrycznego przez złącza dwóch różnych materiałów przewodzących (lub półprzewodnikowych) powoduje wymianę ciepła [155–157]. W miniaturowych urządzeniach stosowane są także ogniwa zwane mikroPeltier [158, 159].

Wzrost temperatury w urządzeniach małoskalowych można uzyskać również w wyniku promieniowania (zwykle z zakresu IR). Ogrzewanie powstaje na skutek absorpcji energii, gdzie źródłem promieniowania może być laser lub dioda elektroluminescencyjna [160–162]. Stosowany jest również mechanizm z wykorzystaniem procesów chemicznych (egzo- i endotermicznych) do lokalnej kontroli temperatury. Źródłem ciepła jest reakcja chemiczna, nie zaś dostarczana energia elektryczna. System zwykle jest tak zaprojektowany, aby reagenty trafiały w odpowiednie strefy i ulegały reakcji *in situ* [163, 164]. Istnieją również rozwiązania wykorzystujące ogrzewanie mikrofalowe [165–168] oraz akustyczne (ultradźwiękowe) [169, 170].

Przez ostatnie lata liczba zastosowań mikrogrzejników znacząco wzrosła ze względu na ich ważną rolę w aplikacjach czujnikowych i mikroanalitycznych [147, 171–173], jak np.: termiczne czujniki przepływu [147, 174], czujniki gazów [175], wykrywanie gazu LPG (ang. *liquefied petroleum gas*) [176] i śladowych ilości materiałów wybuchowych [177], termiczne wytwarzanie energii elektrycznej w mikrokanałach [178] oraz sterowanie temperaturą środowiska

dla procesów chemicznych i biologicznych w małej skali [179]. Rozwój urządzeń zminiaturyzowanych do hodowli komórek i amplifikacji DNA poprawia możliwości diagnostyki dzięki możliwości wykonywania badań w miejscu opieki nad pacjentem [180, 181]. Wykorzystanie cykli termicznych do kontrolowania i regulowania temperatury odgrywa kluczową rolę w wielu zastosowaniach biologicznych, chemicznych i fizycznych. W urządzeniach Lab-on-a-Chip tę funkcję spełniają mikrogrzejniki [182]. Niektóre zastosowania wymagające precyzyjnego kontrolowania temperatury to reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), mikroprzepływy, mieszanie i krystalizacja białek. PCR jest szeroko stosowana w biologii molekularnej do amplifikacji docelowego DNA *in vitro* [183].

Mikrogrzejniki znajdują szerokie zastosowanie w nowoczesnych technologiach, w tym także w szybko rozwijającym się sektorze urządzeń noszonych oraz w systemach przeznaczonych do eksploracji przestrzeni kosmicznej [184, 185]. Są również z powodzeniem wykorzystywane w drukarkach atramentowych jako elementy aktywne sterujące wypływem tuszu [186].

Temperatura mikrogrzejnika zależy od wielu czynników fizycznych, w tym elektrycznych, mechanicznych i termicznych, a także właściwości zastosowanego materiału i konstrukcji geometrycznych. Podstawowymi parametrami mikrogrzejników są:

- krótki czas reakcji,
- niskie zużycie energii,
- wysoka rezystancja elementu grzejącego,
- wytrzymałość na wysoką temperaturę.

Konstrukcja i materiał mikrogrzejnika odgrywają kluczową rolę w zapewnieniu niskiego zużycia energii, niewielkiej masy termicznej, efektywnej równomierności temperatury w całym urządzeniu oraz zwiększonej izolacji termicznej od otoczenia. Dodatkowo rezystancja jest bardzo zależna od fizycznych wymiarów mikrogrzejnika – zmniejszenie grubości rezystora grzewczego zwiększa jego rezystancję, co prowadzi do spadku poboru mocy i temperatury nagrzewania [172, 187–190]

Najczęściej stosowanymi materiałami do budowy mikrogrzejników są platyna (Pt), polikrzem (poli-Si) i chromonikielina (NiCr) [172]. Ponadto

stosowano również rezystory grzewcze wykonane z niklu (Ni), wolframu (W), aluminium (Al), grafenu [191], nanorurek węglowych (CNT), DilverP1 (stop Ni/Co/Fe) i wielu innych stopów metali [187, 192–194]. Oprócz mikrogrzejników wykonanych z materiałów stałych prowadzone są również badania z wykorzystaniem ciekłego metalu (EGaIn) [195].

Pomiar temperatury stanowi integralny element kontroli termicznej mikrogrzejników. Może być realizowany za pomocą czujników zewnętrznych, takich jak detektory podczerwieni lub kamery termowizyjne [191, 196], albo przez przyrządy zintegrowane z układem. W rozwiązaniach cienkowarstwowych najczęściej stosuje się termistory wykonane z platyny [197, 198], niklu [192] lub krzemu amorficznego [199], a temperatura wyznaczana jest na podstawie zmian ich rezystancji. Alternatywnie wykorzystuje się zależność rezystancji samego elementu grzejnego od temperatury [191, 200] lub czujniki termoelektryczne działające w oparciu o efekt Seebecka [201].

Na podstawie analizy literatury przedmiotu można stwierdzić, że najczęściej wykorzystywaną oraz jedną z najbardziej efektywnych metod generowania ciepła w miniaturowych układach pozostaje grzanie rezystancyjne. Do budowy mikrogrzejników w ramach realizowanych badań wybrano najbardziej rozpowszechniony stop NiCr, składający się w 80% z niklu i 20% z chromu. W porównaniu z materiałami takimi jak platyna (Pt), złoto (Au) oraz srebro (Ag) chromonikielina jest uznawana za szczególnie korzystny materiał do zastosowań grzejnych. Wynika to przede wszystkim z jej relatywnie wysokiej rezystywności elektrycznej (ok.  $1\text{--}1,5 \cdot 10^{-6} \Omega\text{m}$ ). Dodatkowymi atutami są dobra przewodność cieplna ( $11,3 \text{ W}/(\text{m} \cdot \text{K})$ ), niemal zerowy temperaturowy współczynnik rezystancji (TCR), wysoka temperatura topnienia ( $\sim 1400^\circ\text{C}$ ), a także bardzo dobra stabilność temperaturowa i wysoka odporność na procesy utleniania. Istotną zaletą technologiczną tego materiału jest również brak konieczności stosowania warstw adhezyjnych, co upraszcza proces wytwarzania cienkowarstwowych mikrogrzejników i zwiększa jego efektywność ekonomiczną w porównaniu z rozwiązaniami wykorzystującymi platynę [142–144, 202, 203]. Ze względu na powyższe właściwości chromonikielina jest często stosowana jako element grzejny w układach mikroelektronicznych, mikro-systemach MEMS oraz miniaturowych urządzeniach analitycznych [172].

## 4.2. Badania nad metodą lokalnej kontroli temperatury w hodowlach komórkowych

W hodowli komórkowej utrzymanie określonej temperatury przez dłuższy czas jest istotne dla lepszej replikacji komórek biologicznych. Zazwyczaj wartość ta pozostaje stała przez cały okres trwania hodowli. Typową temperaturą, w której prowadzone są hodowle *in vitro* komórek zwierzęcych i ludzkich, jest  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . W wielu przypadkach badania mogą być prowadzone w temperaturze pokojowej, a nawet dużo niższej (np.  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [204]. W przypadku prowadzenia badań wymagających porównania wyników rozwoju komórek w różnych temperaturach, np. odzwierciedlających ich zachowania podczas gorączki organizmu, temperatura jest o  $2\text{--}3\text{ }^{\circ}\text{C}$  wyższa [205]. Tego typu prace doświadczalne pozwalają ocenić np. reakcję komórek na podany lek przy jednoczesnej gorączce. Analogiczna sytuacja występuje przy symulacji wychłodzonego organizmu. W takim przypadku temperatura zadana podczas hodowli może być o kilka stopni niższa.

W przypadku prowadzenia pomiarów właściwości próbek biologicznych w zmiennych warunkach temperaturowych napotyka się istotne ograniczenia związane z zapewnieniem wysokiej powtarzalności warunków hodowlanych. W hodowlach *in vitro* komórki utrzymywane są w ściśle kontrolowanym środowisku inkubatora, w którym regulowane są temperatura, wilgotność oraz skład gazowy atmosfery. W celu umożliwienia porównania próbek komórkowych będących w tej samej fazie wzrostu, pochodzących z tej samej linii komórkowej i hodowanych w identycznych warunkach środowiskowych – przy jedynej zmiennej w postaci temperatury – niezbędne jest zastosowanie odpowiednich procedur kontrolnych, do których mogą należeć m.in.:

- zmiana (podniesienie/obniżenie) temperatury na pewien okres w trakcie tej samej hodowli i porównywanie wyników obserwacji przed i po dokonaniu zmiany warunków termicznych [206]. Zaletami tej metody są identyczne warunki środowiskowe (atmosfera w komorze klimatycznej) oraz zastosowanie dokładnie tych samych komórek w innej temperaturze. Jednak cechą tej metody jest porównywanie tej samej hodowli na różnym etapie wzrostu – komórki mogą znajdować się już na innym etapie rozwoju w stosunku do tego przed zmianą temperatury.

- przeprowadzenie oddzielnych hodowli komórek w różnych temperaturach, co umożliwia porównanie wyników w tych samych fazach wzrostu komórek. Główną zaletą tej metody jest łatwość analizy zmian zachodzących w czasie. Jej wadą jest jednak fakt, że komórki wprowadzane do hodowli mogą pochodzić z różnych dni, co może prowadzić do różnic w ich cyklu życiowym [206, 207]. Jednym ze sposobów ograniczenia tego problemu jest równoległa hodowla w dwóch oddzielnych inkubatorach komórek pobranych w tej samej fazie wzrostu [209].

Proponowanym w niniejszej pracy rozwiązaniem, umożliwiającym bezpośrednie porównanie wpływu temperatury na hodowle komórkowe, jest metoda selektywnego, lokalnego ogrzewania pojedynczych naczyń hodowlanych w obrębie wspólnego podłoża pomiarowego. Metoda ta pozwala na równoległe prowadzenie eksperymentów z komórkami pochodzącymi z tej samej puli, w tej samej fazie wzrostu i w identycznych warunkach środowiskowych inkubatora (np. stężenie CO<sub>2</sub>, wilgotność) przy jednoczesnym zastosowaniu zróżnicowanych reżimów temperaturowych wyłącznie dla wybranych studzienek.

Kluczową zaletą tego podejścia jest izolacja zmiennej temperaturowej. Wszystkie inne potencjalnie zakłócające czynniki (pochodzenie komórek, skład pożywki, warunki gazowe) są utrzymywane na identycznym poziomie, a zatem wszelkie zaobserwowane statystycznie istotne różnice w parametrach biologicznych lub biofizycznych mogą być wiarygodnie przypisane wyłącznie efektowi kontrolowanej zmiany temperatury. Eliminuje to wpływ zmiennych zakłócających i zmienności między hodowlami, zwiększając tym samym wiarygodność analizy termicznej odpowiedzi komórek.

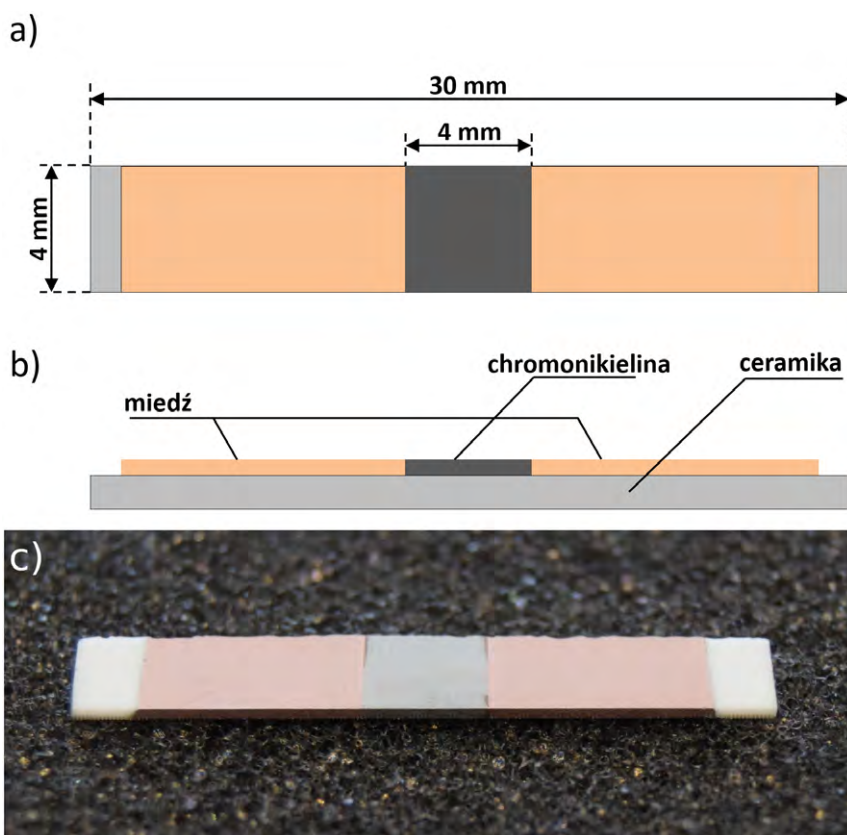
W celu realizacji tego rozwiązania zaproponowano zastosowanie mikrogrzejnika o wymiarach zbliżonych do powierzchni dna pojedynczego naczynia hodowlanego. Parametry sterujące mikrogrzejnika powinny zapewniać dostarczenie odpowiedniej mocy cieplnej tak, aby temperatura w wybranym naczyniu hodowlanym była podwyższona, przy jednoczesnym braku istotnego wpływu na warunki termiczne w sąsiednich studzienkach. Tym samym w obrębie jednej macierzy hodowlanej możliwe jest równoczesne utrzymywanie jednej lub kilku studzienek w podwyższonej temperaturze, podczas gdy pozostałe służą jako referencyjne w identycznych warunkach środowiskowych, z wyłączeniem czynnika termicznego.

#### 4.2.1. Realizacja mikrogrzejnika cienkowarstwowego na podłożu ceramicznym

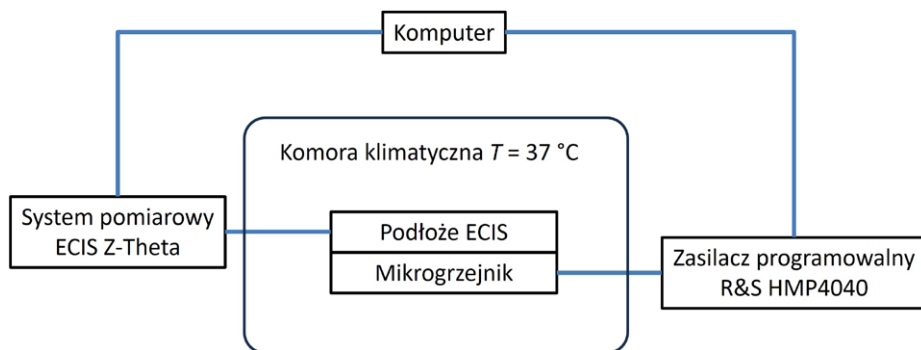
W tej części badań opracowano mikrogrzejnik zdolny do lokalnego podniesienia temperatury o kilka stopni Celsjusza oraz zapewnienia jej stabilności w czasie, co jest istotne dla prowadzenia długoterminowych eksperymentów biologicznych. W opisywanym tu rozwiązaniu zastosowano planarny rezystor grzejny na podłożu ceramicznym. Tworzy on wraz z elektrodami grzebienio-wymi dwufunkcyjny układ umożliwiający jednoczesną kontrolę temperatury i przeprowadzanie badań hodowli komórkowych z wykorzystaniem techniki impedancyjnej ECIS. Zaprojektowany przyrząd umożliwia minimalizację odległości pomiędzy powierzchnią podłoża do hodowli komórkowej a płaszczyzną elementu grzewczego, co zapewnia wysoką efektywność termiczną i precyzyjne sterowanie warunkami środowiskowymi w naczyniu hodowlanym. Jednocześnie pozwala na zachowanie kompatybilności z oryginalną stacją bazową systemu pomiarowego ECIS Z-Theta, umożliwiając montaż podłoża testowego bez konieczności modyfikacji urządzenia.

Podstawę wytworzonego mikrogrzejnika stanowiła płytka z ceramiki alundowej o grubości  $635\text{ }\mu\text{m}$ , długości 30 mm i szerokości 4 mm. Materiał ten jest korzystnym rozwiązaniem jako podstawa lub obudowa urządzeń pracujących w wysokich temperaturach. Charakteryzuje się dobrą przewodnością cieplną (ok.  $28\text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ ), znaczącą wytrzymałością mechaniczną, dużą odpornością na czynniki chemiczne oraz dobrymi właściwościami dielektrycznymi. Cienkowarstwowo element grzejny wytworzono bezpośrednio na podłożu za pomocą dwóch warstw: miedzi i chromonikieliny osadzonych metodą rozpylania magnetronowego. Miedź o grubości 390 nm zastosowano jako metalizację umożliwiającą wykonanie połączeń elektrycznych. Wymiary obszaru grzejnego z chromonikieliny wynoszą  $4 \times 4\text{ mm}^2$ , zaś grubość warstwy ok. 250 nm (ryc. 4.2a, b). Odwzorowanie geometrii planarnego grzejnika realizowano metodą maskowania powierzchni z wykorzystaniem taśmy kaptonowej, po czym na odsłonięte obszary nanoszono warstwę metalu w procesie napyłania. Po zakończeniu osadzania taśma kaptonowa była usuwana, co umożliwiało uzyskanie określonych geometrycznie struktur (ryc. 4.2c) [50, 210].

Stanowisko do pomiarów termiczno-elektrycznych składa się z zestawu ECIS Z-Theta i programowalnego zasilacza. Podłoże z naczyniami hodowlanymi, zawierające elektrody pomiarowe oraz mikrogrzejnik, jest umieszczane wewnątrz komory klimatycznej (ryc. 4.3). Zasilanie mikrogrzejnika realizowane jest za pomocą oprogramowania sterującego, które umożliwia automatyczne załączanie zasilacza w zadanych przedziałach czasowych, prowadząc do lokalnego podwyższenia temperatury w wybranym naczyniu hodowlanym. Opracowany mikrogrzejnik umieszczono bezpośrednio pod podłożem z przetwornikiem impedancyjnym, zapewniając efektywny transfer ciepła do obszaru, w którym podczas hodowli tworzy się monowarstwa komórkowa.



**Ryc. 4.2.** Schemat mikrogrzejnika: a) widok z góry, b) przekrój oraz c) wytworzony mikrogrzejnik [50]

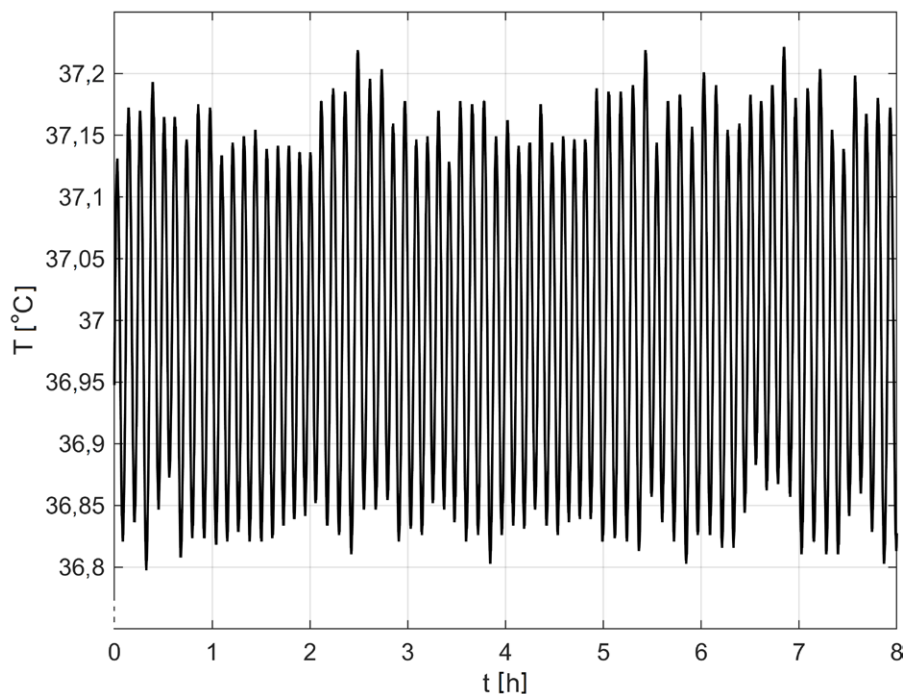


**Ryc. 4.3.** Schemat monitorowania metodą ECIS hodowli komórkowej z dołączonym mikrogrzejnikiem do lokalnej zmiany temperatury

Do wyznaczenia charakterystyk termiczno-elektrycznych wykonanego rezystora wykorzystano stanowisko pomiarowe zawierające komorę klimatyczną, zasilacz programowalny Hameg 4040 firmy Rohde & Schwarz, multi-metry Keysight 34410A oraz czujniki temperatury Pt100 i Pt1000. Układami pomiarowymi sterowano przy użyciu programów opracowanych w środowiskach LabView i Matlab.

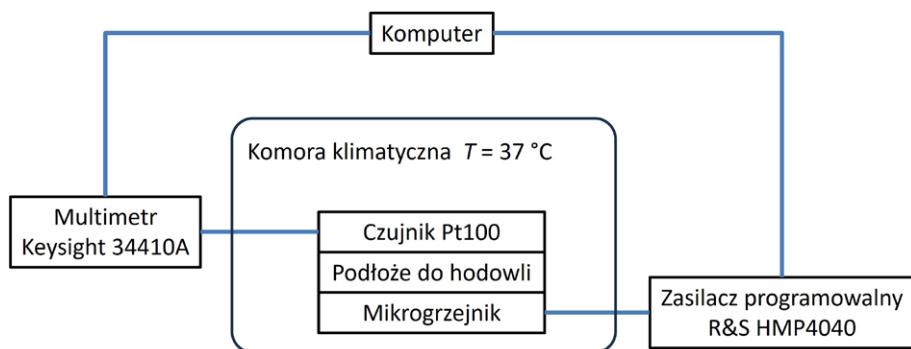
Mikrogrzejnik został scharakteryzowany najpierw jako samodzielny element, a następnie w konfiguracji roboczej po dołączeniu do naczynia hodowlanego wypełnionego wodą dejonizowaną. Wartość rezystancji grzejnika wynosiła  $R = 55,417 \Omega$ . Przed przystąpieniem do właściwej analizy efektywności lokalnego ogrzewania przeprowadzono pomiary zmian rezystancji grzejnika w funkcji temperatury. Nie zanotowano istotnych (mierzalnych) zmian dla temperatur z zakresu 21–80 °C. Oznacza to, że materiał zapewnia stabilną moc grzania niezależnie od zmieniającej się temperatury roboczej i upraszcza sterowanie układem.

Pomiary termiczne grzejnika przeprowadzono w komorze klimatycznej w stałej temperaturze 37 °C. Wstępna ośmiogodzinna weryfikacja stabilności termicznej komory z wykorzystaniem czujnika Pt100 potwierdziła, że temperatura utrzymywała się w zakresie 37,0 °C  $\pm$  0,2 °C (ryc. 4.4).



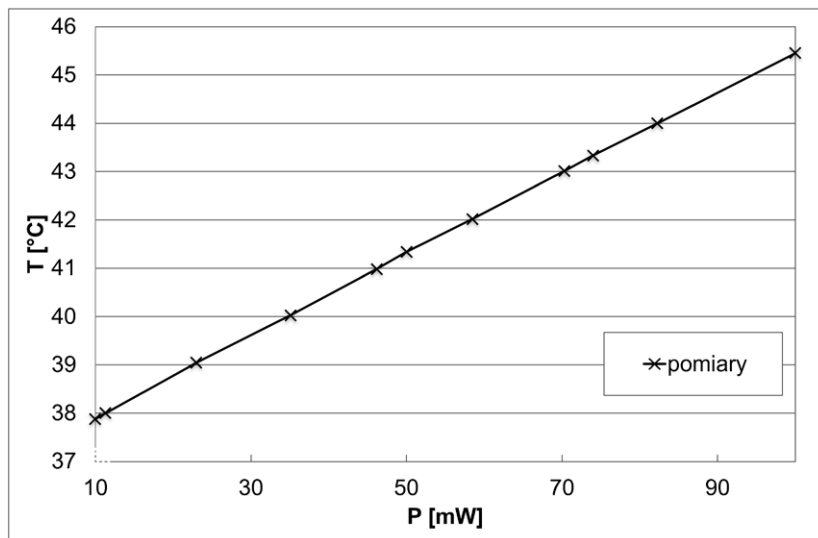
**Ryc. 4.4.** Wahania temperatury w zbudowanej komorze klimatycznej w czasie 8 h

Kolejnym etapem była weryfikacja stabilności i dynamiki temperatury w układzie roboczym. Pomiar temperatury przeprowadzono na dnie naczynia hodowlanego z mikrogrzejnikiem umieszczonym bezpośrednio pod podłożem do hodowli (ryc. 4.5).



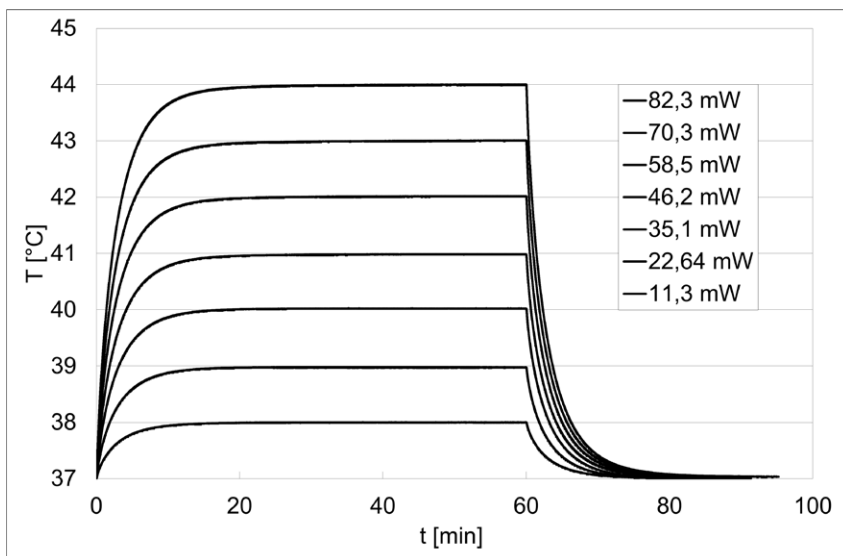
**Ryc. 4.5.** Schemat stanowiska do pomiaru temperatury na dnie naczynia hodowlanego, pod którym umieszczono mikrogrzejnik

Określono zależność temperatury od mocy elektrycznej dostarczanej do mikrogrzejnika. Badania przeprowadzono dla mocy w zakresie 10–100 mW. Uzyskana charakterystyka (ryc. 4.6) miała w badanym zakresie charakter liniowy.



**Ryc. 4.6.** Charakterystyka temperatury w obszarze tworzenia się monowarstwy komórek w funkcji mocy mikrogrzejnika

Na podstawie wyznaczonej charakterystyki określono moc niezbędną do osiągnięcia temperatury docelowej w przedziale 38–44 °C, z krokiem co 1 °C. Dla każdej z tych wartości mocy przeprowadzono osobne zautomatyzowane cykle pomiarowe w celu rejestracji pełnej dynamiki termicznej układu. Każdy cykl składał się z godzinnej fazy aktywnego grzania z zadaną stałą mocą, podczas której temperatura była rejestrowana za pomocą czujnika Pt100, a następnie z półgodzinnej fazy pasywnego chłodzenia po automatycznym wyłączeniu zasilania (ryc. 4.7). Układem pomiarowym sterowano za pomocą wirtualnego systemu pracującego w środowisku LabView przygotowanego przez autora. Celem była ocena długoterminowej stabilności temperaturowej w naczyniu hodowlanym poddanym ciągłemu ogrzewaniu. W trosce o pełną powtarzalność i porównywalność wyników każdą serię pomiarową dla nowej wartości mocy rozpoczynano dopiero po całkowitym ostygnięciu układu do temperatury początkowej (37,0 °C) [50].



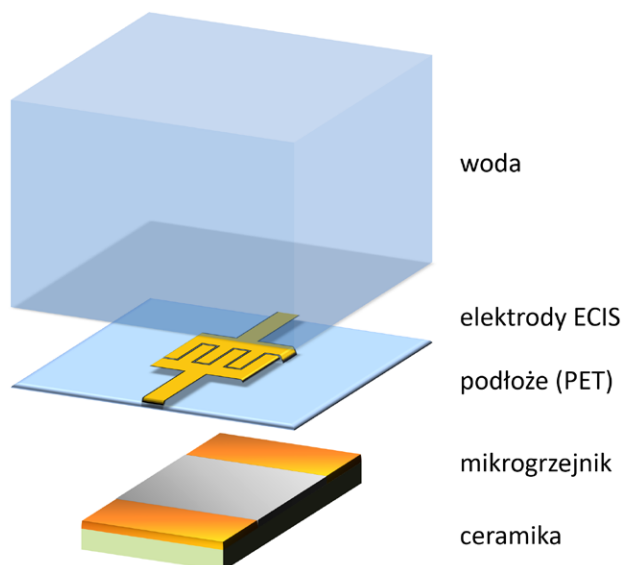
**Ryc. 4.7.** Charakterystyki temperatury na dnie naczynia hodowlanego w funkcji czasu dla różnych mocy zasilania mikrogrzejnika. Krzywe przedstawiają fazę godzinnego aktywnego nagrzewania (zasilanie włączone), po którym następuje półgodzinna faza pasywnego studzenia (zasilanie wyłączone) aż do powrotu do temperatury początkowej otoczenia ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) [50]

Podsumowując, przeprowadzone badania eksperymentalne potwierdziły funkcjonalność opracowanego planarnego mikrogrzejnika z chromonikieliny wykonanego na podłożu ceramicznym. Układ ten umożliwia kontrolowane podniesienie temperatury w wybranym naczyniu hodowlanym. Dzięki umieszczeniu elementu grzejnego bezpośrednio pod dnem naczynia zapewniono efektywny transfer ciepła do strefy, w której podczas hodowli formuje się monowarstwa komórkowa. Analiza charakterystyki termiczno-elektrycznej wykazała, że układ ten pracuje stabilnie w całym testowanym zakresie temperatur roboczych ( $38\text{--}44^\circ\text{C}$ ), pozwalając na długotrwałe utrzymanie zadanej wartości z wysoką precyzją i bez istotnych fluktuacji. Rezystor grzewczy zachowywał stałą rezystancję w badanym zakresie temperatur, co potwierdza powtarzalność działania układu.

#### 4.2.2. Modelowanie układu przetwornik impedancyjny – mikrogrzejnik do hodowli komórkowej

Modelowanie jest istotnym działaniem wspomagającym projektowanie w technice, umożliwiając redukcję kosztów, optymalizację procesów technologicznych oraz szczegółową analizę zjawisk zachodzących w projektowanej strukturze [211]. Pomimo niewielkiej liczby podzespołów, opracowany układ grzania lokalnego jest dość skomplikowany w analizie termicznej. Jest to spowodowane małymi rozmiarami, koniecznością kontroli temperatury w całej objętości układu oraz zmiennością parametrów poszczególnych warstw w funkcji temperatury. Dodatkowo w procesie analizy występuje konieczność uwzględnienia wymiany ciepła z otoczeniem na drodze radiacji i konwekcji.

W celu weryfikacji działania układu wzorowanego na rycinie 4.1 opracowywano jego trójwymiarowy model w środowisku CoventorWare (ryc. 4.8). Oprogramowanie to umożliwia wielodomenowe modelowanie mikro- i nanostruktur oraz prowadzenie symulacji elektrycznych, mechanicznych, termicznych, elektrostatycznych, piezoelektrycznych, mikrofluidycznych, a także analiz sprzężonych, takich jak symulacje termoelektryczne [212].



**Ryc. 4.8.** Model układu obejmującego naczynie hodowlane wypełnione wodą, elektrody kondensatora do pomiaru impedancji na podłożu PET oraz mikrogrzejnik z NiCr na podłożu ceramicznym; elementy zostały celowo rozseparowane w celu zwiększenia czytelności schematu [50]

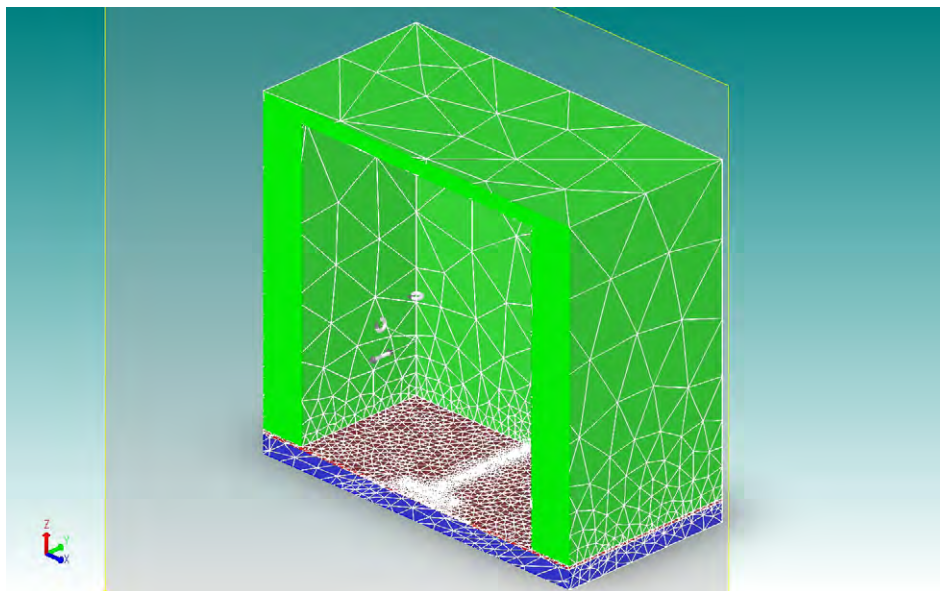
W procesie modelowania uwzględniono pełny układ pomiarowy. Model konstrukcyjny obejmował planarny mikrogrzejnik z chromonikieliny z miedzianymi polami kontaktowymi zrealizowany na podłożu ceramicznym. W modelu uwzględniono naczynie hodowlane wypełnione cieczą oraz elektrody kondensatora, przy czym właściwości fizyczne zastosowanych materiałów (złota, PET oraz wody) zaczerpnięto z bazy materiałowej pakietu CoventorWare (tab. 4.1). Jako element grzejny przyjęto warstwę chromonikieliny o grubości 250 nm, odpowiadającą parametrom opisanego wcześniej mikrogrzejnika. Elektrody kondensatora zamodelowano jako warstwę złota o grubości 50 nm, zgodną z grubością metalizacji w komercyjnych podłożach pomiarowych systemu ECIS. Przyjęto geometrię i rozmiary kondensatora grzebieniowego wykorzystanego do badań biokompatybilności i opisanego w rozdziale 3. Mechanizm grzania zamodelowano poprzez przyłożenie różnicy potencjałów do miedzianych pól kontaktowych. Wymuszało to przepływ prądu elektrycznego przez element rezystywny z NiCr, co skutkowało emisją ciepła. Celem symulacji było określenie rozkładu i wartości temperatury na powierzchni podłoża w obszarze formowania się monowarstwy komórkowej, wynikających z przyłożonej mocy [50, 213].

**Tabela 4.1.** Fizyczne właściwości materiałów zastosowanych w modelu układu naczynia hodowlanego z mikrogrzejnikiem

| Materiał         | Przewodność cieplna<br>[pW/μm·K] | Ciepło właściwe<br>[pJ/kg·K] |
|------------------|----------------------------------|------------------------------|
| PET              | $2,1 \cdot 10^5$                 | $1,2 \cdot 10^{15}$          |
| NiCr             | $1,13 \cdot 10^7$                | $4,5 \cdot 10^{14}$          |
| Au               | $2,97 \cdot 10^8$                | $1,287 \cdot 10^{14}$        |
| H <sub>2</sub> O | $5,9 \cdot 10^5$                 | $4,18 \cdot 10^{15}$         |

Symulacje numeryczne opracowanego modelu przeprowadzono z wykorzystaniem metody elementów skończonych (ryc. 4.9). Jako warunek brzegowy przyjęto stałą temperaturę  $T = 310 \text{ K}$  ( $37^\circ \text{C}$ ) na zewnętrznych ścianach modelu, co bezpośrednio odwzorowuje warunki panujące w inkubatorze komórkowym. Aby zapewnić realistyczne odwzorowanie układu, w modelu uwzględniono współczynniki przewodzenia ciepła dla wszystkich zastosowanych materiałów (ceramika, NiCr, Au, PET, woda). Umożliwiło to symulację

złożonego procesu transportu ciepła przez przewodzenie w ciałach stałych oraz sprężenia na granicach faz (np. między podłożem ceramicznym a dnem naczynia, czy między naczyniem a cieczą).

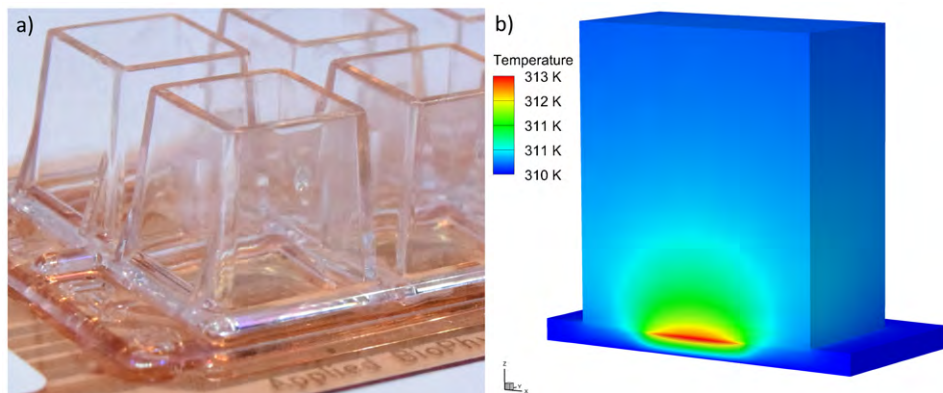


**Ryc. 4.9.** Siatka wygenerowana dla modelu układu: mikrogrzejnik – przetwornik impedancyjny – naczynie do hodowli komórek [50]

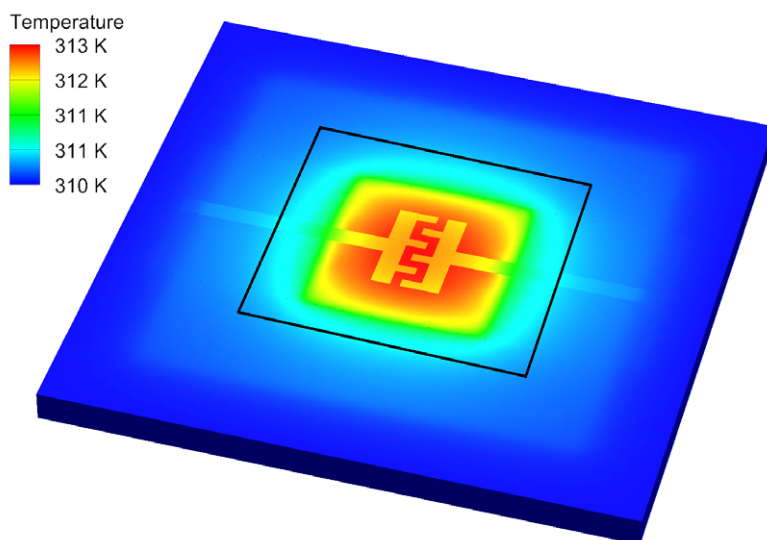
Wyniki symulacji potwierdziły dobrą zgodność pomiędzy opracowanym modelem obliczeniowym i pomiarami rzeczywistego układu lokalnego ogrzewania. Na rycinie 4.10b przedstawiono rozkład temperatury w układzie z mikrogrzejnikiem. Zauważalny jest wzrost temperatury bezpośrednio nad mikrogrzejnikiem, przy jednoczesnym minimalnym jej wzroście w pobliżu ścianek naczynia (poniżej 1 °C). Oznacza to, że ciepło generowane przez mikrogrzejnik jest efektywnie rozpraszane w objętości cieczy wewnątrz naczynia, natomiast na granicy układu (ścianki naczynia) jest skutecznie odprowadzane do otoczenia inkubatora.

Dodatkowa wizualizacja (ryc. 4.11) przedstawia rozkład temperatury na dnie naczynia po dostarczeniu mocy 22,64 mW, odpowiadającej docelowej temperaturze 39 °C. Dla lepszej czytelności, w celu uwidocznienia gradientu temperatury w obszarze komórek, z wizualizacji usunięto warstwę wody. Obraz ten

jednoznacznie potwierdza, że ciepło jest generowane i skupione w centralnej, aktywnej części podłoża. Wyniki symulacji potwierdzają, że zaprojektowany mikrogrzejnik realizuje założenie lokalnego ogrzewania. Jego wpływ termiczny jest ograniczony niemal wyłącznie do docelowego naczynia, nie oddziałując w istotny sposób na warunki w sąsiednich hodowlach [50].

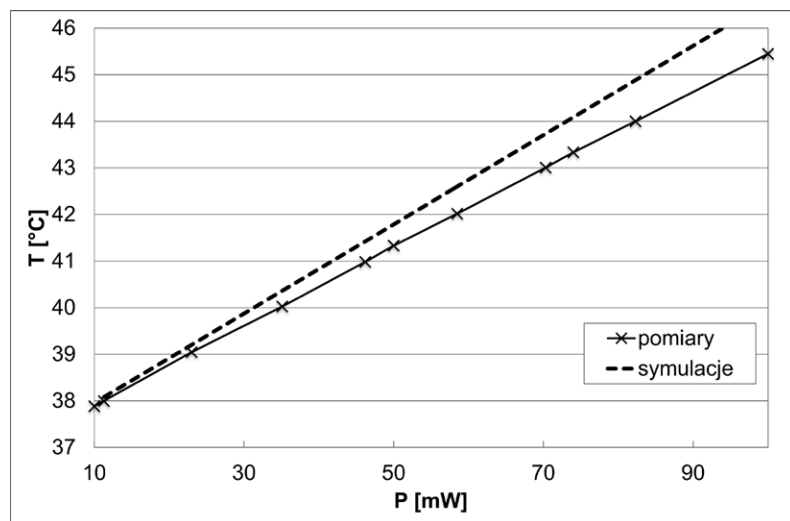


**Ryc. 4.10.** a) Naczynie hodowlane; b) rozkład temperatury w przekroju naczynia hodowlanego z przetwornikiem impedancyjnym i mikrogrzejnikiem dla mocy rozpraszanej wynoszącej 22,6 mW [50]



**Ryc. 4.11.** Rozkład temperatury na podłożu hodowlanym w obszarze tworzenia się monowarstwy komórek dla mocy rozpraszanej z mikrogrzejnika wynoszącej 22,64 mW (czarnym kolorem oznaczono powierzchnię ograniczoną ściankami naczynia hodowlanego) [50]

Wyniki uzyskane z symulacji układu mikrogrzejnik – przetwornik impedancyjny – naczynie hodowlane porównano z empirycznymi wartościami otrzymanymi z pomiarów charakterystyki termiczno-elektrycznej (ryc. 4.6). W zakresie temperatur 37–40 °C różnica między wartością symulowaną a zmierzoną była mniejsza niż 0,5 °C, co potwierdza dokładność modelu w typowym zakresie fizjologicznym. W miarę wzrostu temperatury powyżej 40 °C zaobserwowano zwiększający się rozrzut między danymi symulacyjnymi a pomiarowymi (ryc. 4.12).



**Ryc. 4.12.** Charakterystyki temperatury w obszarze tworzenia się monowarstwy komórek w funkcji mocy mikrogrzejnika dla rzeczywistego oraz zamodelowanego układu [50]

Przeprowadzone badania nad metodą lokalnej kontroli temperatury w hodowlach komórkowych miały na celu ocenę możliwości selektywnego kształtowania warunków termicznych w obrębie pojedynczych naczyń hodowlanych przy jednoczesnym zachowaniu niezmiennych parametrów środowiskowych w pozostałej części układu. Opracowany mikrogrzejnik planarny z chromonikieliny na podłożu ceramicznym umożliwia efektywny transfer ciepła do monowarstwy komórek i utrzymanie stabilnej temperatury, niezbędnej dla długotrwałych eksperymentów biologicznych. Dzięki minimalnej odległości pomiędzy powierzchnią grzejnika a dnem naczynia uzyskano wysoką efektywność transferu ciepła, co umożliwia podniesienie temperatury w wybranym naczyniu o kilka stopni Celsjusza w sposób kontrolowany i powtarzalny.

Charakterystyka termiczno-elektryczna opracowanego mikrogrzejnika potwierdziła stabilność jego pracy w zakresie temperatur istotnych z punktu widzenia hodowli komórek *in vitro* (38–44 °C). Stabilność rezystancji elementu grzejnego w funkcji temperatury świadczy o wysokiej powtarzalności i niezawodności zaproponowanego rozwiązania, co jest kluczowe w długoterminowych eksperymentach biologicznych.

W celu weryfikacji i lepszego zrozumienia działania układu opracowano trójwymiarowy model w środowisku CoventorWare, uwzględniający wszystkie warstwy materiałowe, wymianę ciepła z otoczeniem oraz przepływ prądu przez rezystor grzejny. Przeprowadzone symulacje numeryczne pozwoliły na wizualizację przepływu ciepła i wskazanie nagrzewanych obszarów oraz wykazały zgodność z wynikami pomiarów termicznych układu. Rozkład temperatury w modelu potwierdził kumulację ciepła bezpośrednio nad mikrogrzejnikiem i minimalny wzrost temperatury przy ściankach naczynia, co dowodzi selektywności lokalnego ogrzewania.

Podsumowując, zastosowanie mikrogrzejnika w połączeniu z przetwornikiem impedancyjnym umożliwia równoczesną kontrolę temperatury i monitorowanie odpowiedzi biologicznej komórek techniką pomiaru impedancji ECIS. Dzięki temu możliwe jest jednoznaczne przypisanie obserwowanych zmian biologicznych efektowi kontrolowanej modyfikacji warunków termicznych. Zaproponowane rozwiązanie może stanowić efektywne narzędzie do badań wpływu temperatury na rozwój i zachowanie komórek *in vitro*.

#### **4.3. Badania nad termicznym uszkodzeniem monowarstwy komórkowej**

Badania przedstawione w niniejszym podrozdziale dotyczą opracowania i zastosowania mikrogrzejnika do kontrolowanego wywoływania lokalnych uszkodzeń termicznych w monowarstwie komórek w warunkach *in vitro*. Celem prac było zbadanie tworzenia się rany oparzeniowej w kierunku opracowania nowej metody leczenia zranienia termicznego. Osiągnięto to poprzez miejscowe podniesienie temperatury w ograniczonym obszarze dna naczynia hodowlanego, co prowadziło do utraty adhezji komórek oraz przerwania ciągłości

monowarstwy. Opisano przebieg eksperymentalnych hodowli komórkowych z wykorzystaniem zaprojektowanych mikrogrzejników oraz komercyjnego podłoża 8W10E z przetwornikami impedancyjnymi. Przedstawiono odpowiedzi komórek na oddziaływanie termiczne z użyciem techniki impedancyjnej ECIS. Zaprezentowano procedurę prowadzenia eksperymentów oraz analizę zmian impedancji, rezystancji i pojemności w czasie trwania hodowli. Wyniki uzupełniono obserwacjami mikroskopowymi, które umożliwiły ocenę stopnia uszkodzenia monowarstwy oraz jej zdolności do regeneracji po zakończeniu działania czynnika termicznego.

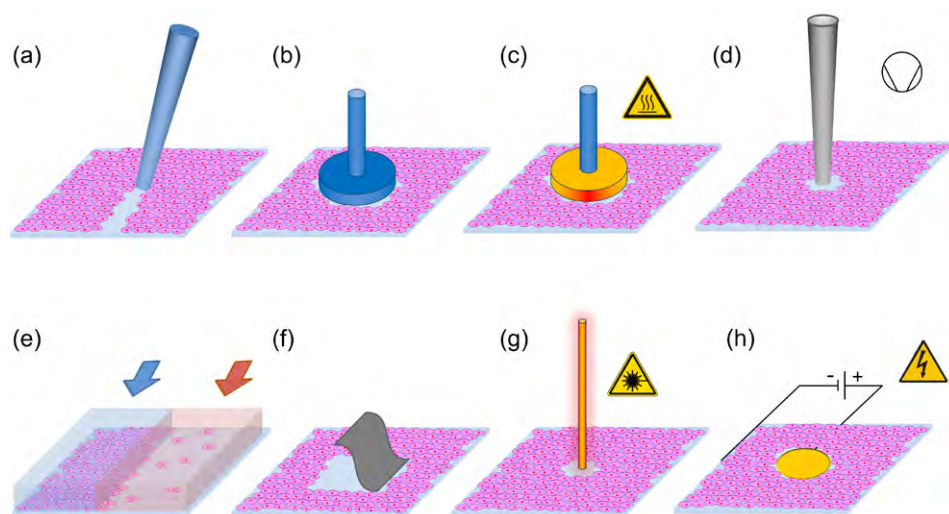
Gojenie się ran jest niezbędne do przywrócenia funkcji barierowej skóry. Podczas tego procesu komórki na brzegach rany proliferują i migrują, dążąc do powstania ponownego nabłonka na powierzchni rany. Testy gojenia ran służą do analizy molekularnych mechanizmów tego procesu oraz do oceny potencjalnych środków terapeutycznych i metod leczenia wspomagających regenerację tkanek. Badania nad gojeniem się ran wyjaśniają podstawowe mechanizmy leżące u podstaw tego procesu, ale także torują drogę do poprawy już istniejących metod leczenia klinicznego.

Skóra jest największym powierzchniowo organem ludzkiego ciała, a utrzymanie jej funkcji barierowej jest niezbędne dla każdego sprawnego organizmu. Dynamiczny proces gojenia się rany można podzielić na pięć etapów, a mianowicie hemostazę, stan zapalny, proliferację, migrację oraz dojrzewanie/przebudowę [214, 215]. W trakcie tego procesu mogą wystąpić powikłania, takie jak infekcje, przewlekłe tworzenie się ran i nadmierne ich gojenie się, prowadzące do blizn przerostowych i bliznowców.

Gojenie ran jest procesem wieloetapowym i wysoce złożonym. W najprostszym modelu jego istotę stanowi migracja komórek z otaczających obszarów w kierunku miejsca uszkodzenia tkanki. W związku z tym testy oceniające zdolność do gojenia bazują na modelach migracji, w których monowarstwa komórkowa jest celowo uszkodzana w ściśle kontrolowanych warunkach, a następnie poddaje się obserwacji i analizie proces odbudowy jej ciągłości. Potencjalne metody leczenia ran mogą być analizowane za pomocą technik *in vitro* jeszcze przed rozpoczęciem eksperymentów *in vivo*. Testy *in vitro* stanowią doskonałe narzędzie do badania wpływu określonych związków oraz zmian genetycznych na proces gojenia. Badania te najczęściej prowadzi się

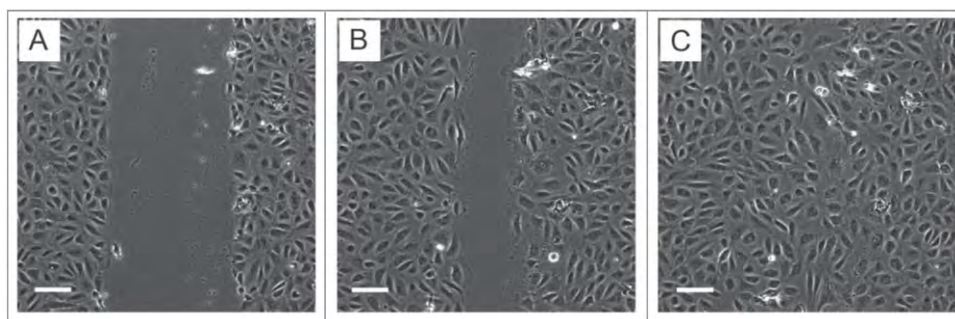
w klasycznym dwuwymiarowym układzie monowarstwy komórek, który cieszy się powszechnym zastosowaniem, ponieważ umożliwia realizację eksperymentów w standardowych warunkach hodowli, z wykorzystaniem aparatury dostępnej w większości laboratoriów [214].

Podstawą typowego testu gojenia ran jest celowe uszkodzenie monowarstwy komórek, co prowadzi do powstania wolnego od nich obszaru, który następnie może zostać odbudowany przez komórki otaczające. Większość takich badań obejmuje trzy etapy: zranienie monowarstwy, monitorowanie procesu gojenia oraz gromadzenie danych (np. za pomocą mikroskopii lub pomiaru impedancji), a następnie analizę uzyskanych wyników. Na rycinie 4.13 przedstawiono najczęściej stosowane metody uszkodzania komórek. Najpopularniejszą z nich jest test zarastania rasy (ang. *scratch assay*), który polega na mechanicznym wprowadzeniu rany w warstwę komórek poprzez drapanie. Dodatkowe metody uszkodzenia komórek obejmują urazy termiczne, elektryczne, chemiczne, mechaniczne i optyczne [215, 216].



**Ryc. 4.13.** Metody uszkodzenia komórek stosowane w testach gojenia ran: test zarastania rasy (a), test stempla (b), test stempla ze zranieniem termicznym (c), wykorzystanie podciśnienia (d), mikrofluidyczny test chemiczny (e), stała bariera (f), ablacja laserowa (g), wykorzystanie napięcia elektrycznego (h) (na podstawie [215])

Jednym z głównych powodów rozpowszechnienia testu zarastania rany jest stosunkowo prosta procedura. W tej metodzie zadrapanie jest wprowadzane do pojedynczej monowarstwy komórek za pomocą ostrego przedmiotu, np. końcówki pipety [217]. Stosowane są również inne urządzenia do drapania, m.in. specjalne skrobaki do komórek i metalowe mikrowgłębniki. Ekspozycja na obszar wolny od komórek powoduje migrację komórek do szczeliny. Sekwencję reprezentatywnych obrazów z testu gojenia ran przeprowadzonego na monowarstwie śródbłonna pokazano na rycinie 4.14 [218]. W tym przykładzie monowarstwę zarysowano końcówką pipety, a migrację do szczeliny obrazowano w ciągu kilku godzin za pomocą mikroskopu optycznego.



**Ryc. 4.14.** Komórki śródbłonna żyły pępkowej człowieka (ang. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) po wykonaniu testu zarysowania za pomocą końcówki pipety oraz w dwóch momentach czasowych w odstępie kilku godzin po uszkodzeniu monowarstwy [217]

Główne wady testu zarastania rany obejmują nieregularne zadrapania podczas ręcznego zranienia oraz możliwe zniszczenie powłok macierzy zewnątrzkomórkowej na szalce do hodowli komórek podczas wprowadzania zadrapań. Ponadto usunięte komórki mogą gromadzić się na krawędzi sztucznie wprowadzonej szczeliny, tworząc zaporę, co może utrudniać analizę danych, a także wpływać na proliferację i migrację niezbędną do zamknięcia rany.

Test zarastania rany jest najbardziej uznanym testem gojenia ran, często porównuje się więc do niego nowe metody. Wiele metod zarysowania opisanych w literaturze to warianty istniejących testów zarysowania ręcznego, tyle że wykorzystują automatyzację w celu uzyskania wysokiej wydajności i powtarzalności [219].

Inną metodą mechanicznego niszczenia komórek *in vitro* jest stemplowanie. Polega ona na przyłożeniu do powierzchni hodowli komórkowej stempla o określonej geometrii i wywarceniu nacisku, ręcznie lub w procesie zautomatyzowanym, w celu lokalnego i kontrolowanego uszkodzenia lub całkowitego usunięcia monowarstwy. Pozostałe szczątki komórek są albo usuwane, albo też pozostają w „zranionym” obszarze. Do większości testów stemplowania używa się formy wykonanej z gumy lub polimerów, takich jak poli(dimetylosiloksan) (PDMS). Formę można również wygrawerować regularnymi wzorami, np. kwadratowymi, koncentrycznymi kołami lub równoległymi liniami. Jeśli szczątki komórkowe pozostaną w miejscu stempla, można zbadać ich wpływ na migrację komórek. Wadą tego testu – jak w przypadku innych metod mechanicznych – jest nieregularność obszaru stemplowanego, zwłaszcza przy ręcznym wywieraniu nacisku na formę.

Z uwagi na to, że uszkodzenia termomechaniczne należą do najczęstszych urazów skóry (np. w wyniku kontaktu z gorącymi przedmiotami), model *in vitro* do badania ich wpływu na komórki stanowi niezwykle przydatne narzędzie. Stosując stemple z kontrolowaną temperaturą, można odróżnić skutki uszkodzeń termomechanicznych od mechanicznych. Wady tej metody obejmują możliwość przenoszenia ciepła poza rzeczywisty obszar uszkodzenia, co może wpływać na niską powtarzalność określonego „zranienia” [220].

Tak jak wspomniano, do badań związanych z gojeniem ran wykorzystywana jest również metoda pomiarów impedancji elektrycznej struktury komórki-podłoża (ECIS). Zranienie monowarstwy komórek w obszarze elektrody uzyskuje się poprzez zastosowanie podwyższonego impulsu elektrycznego, który prowadzi do elektroporacji i śmierci komórki. Na elektrodę podawany jest prąd zmienny, co umożliwia monitorowanie początkowego wzrostu komórek, jak również zranienia i odrastania ich warstwy. Zaletami tej metody są: pomiar w czasie rzeczywistym, a także eliminacja błędów ludzkich dzięki automatyzacji. Wysoka porównywalność wyników pomiędzy kolejnymi eksperymentami jest zapewniona, ponieważ destrukcję i odrost mierzy się za pomocą fizycznego parametru impedancji zamiast wyników optycznych. Wady obejmują trudne odrywanie zlewających się warstw silnie przyłączonych komórek, takich jak keratynocyty i fibroblasty. Dodatkowo zmiany w adhezji (adhezje komórka–komórka i komórka–podłoże) oraz gęstość warstwy komórkowej

mogą wpłynąć na pomiar impedancji. Ponadto podczas zranienia przepływ prądu powoduje wygenerowanie ciepła w najbliższym otoczeniu elektrody, co może dodatkowo wpływać na żywotność komórek znajdujących się w pobliskich obszarach [221, 222].

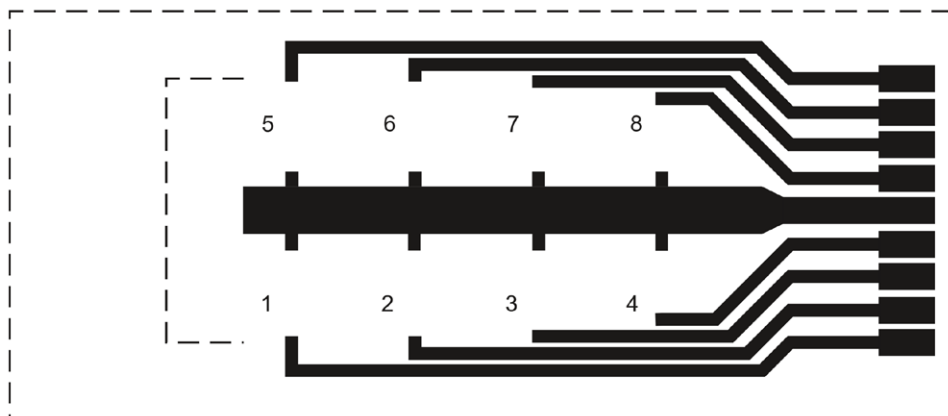
Uszkodzenie monowarstwy komórek może być również realizowane z wykorzystaniem ablacji laserowej, polegającej na usuwaniu komórek za pomocą precyzyjnie ogniskowanej wiązki laserowej. Urazy indukowane impulsami laserowymi charakteryzują się wysoką powtarzalnością i kontrolowalnością, co czyni tę metodę szczególnie przydatną w badaniach wymagających standaryzowanych modeli uszkodzeń komórkowych [223].

#### **4.3.1. Mikrogrzejniki z wykorzystaniem płytki PCB**

Przeprowadzenie testowej hodowli komórkowej w badaniach gojenia ran oparzeniowych wymagało wytworzenia elementów grzejnych montowanych bezpośrednio pod komercyjnym podłożem pomiarowym ECIS o oznaczeniu 8W10E (ryc. 2.5). Wybrane podłoże zawiera osiem naczyń hodowlanych z okrągłą elektrodą pomiarową. Elektroda aktywna jest pokryta warstwą dielektryczną zawierającą dziesięć otworów o średnicy 250  $\mu\text{m}$ . Wybór tego podłoża wynikał z możliwości monitorowania hodowli komórkowej w dziesięciu punktach pomiarowych. Założono, że co najmniej kilka z nich znajdzie się bezpośrednio nad elementem grzejnym w trakcie hodowli, co umożliwi obserwację zmian parametrów elektrycznych podczas lokalnego wzrostu temperatury oraz analizę zachowania komórek po jej powrocie do wartości panującej w inkubatorze.

Realizacja mikrogrzejnika na podłożu ceramicznym w wariantach o bardziej złożonej geometrii okazała się trudna w dostępnych warunkach technologicznych. Problem dotyczył układu zawierającego osiem mikrogrzejników wraz ze ścieżkami doprowadzającymi i polami kontaktowymi. Z uwagi na te ograniczenia zdecydowano się na zastosowanie prostszego rozwiązania, bazującego na płytce drukowanej PCB. Umożliwiło ono wykorzystanie istniejącej warstwy miedzi do wykonania ścieżek przewodzących i pól kontaktowych. Na tak przygotowanym podłożu osadzono następnie warstwę chromonikieliny, która pełniła funkcję rezystancyjnego elementu grzejnego.

Pierwszym etapem prac było zaprojektowanie odpowiedniej maski technologicznej (ryc. 4.15) do przeprowadzenia procesu fotolitografii warstwy miedzi. Projekt maski bazował na układzie ścieżek przedstawionym w rozdziale 2, jednak został zmodyfikowany w celu dołączenia rezystorów z chromonikieliny. Obszary przeznaczone na elektrody pojemnościowe pozostawiono wolne. Miały one w kolejnym etapie technologicznym umożliwić dołączenie i elektryczne połączenie rezystancyjnych mikrogrzejników, tworząc w ten sposób zintegrowaną platformę pomiarowo-grzewczą. Po przeciwnej stronie w stosunku do podłoża hodowlanego projekt zawierał pola montażowe przeznaczone do połączenia z programowalnym zasilaczem. Na masce umieszczono również numerację kolejnych mikrogrzejników, odpowiadającą numeracji naczyń na podłożu pomiarowym ECIS o oznaczeniu 8WE10.



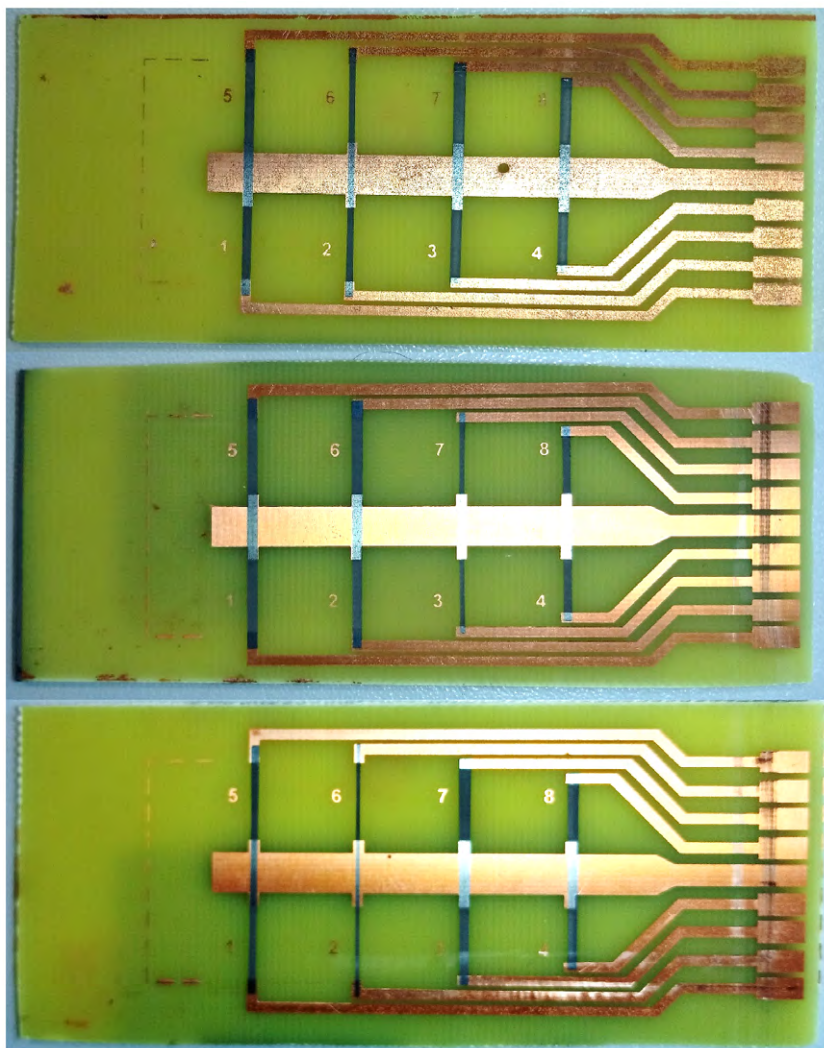
**Ryc. 4.15.** Wzór maski do wytrawienia miedzi na płytce drukowanej

Płytki do wykonania obwodów drukowanych FR-4 o grubości 0,8 mm docięto do rozmiarów 85 mm × 38 mm pasujących do podłoża ECIS 8W10E. Proces fotolitografii przeprowadzono, stosując emulsję światłoczułą Positiv-20. Naświetlanie wykonano przez 3 minuty świetlówką UV-A o mocy 20 W. Wzór wytrawiono za pomocą uniwersalnego wywoływacza AGT-087 firmy AG TermoPasty.

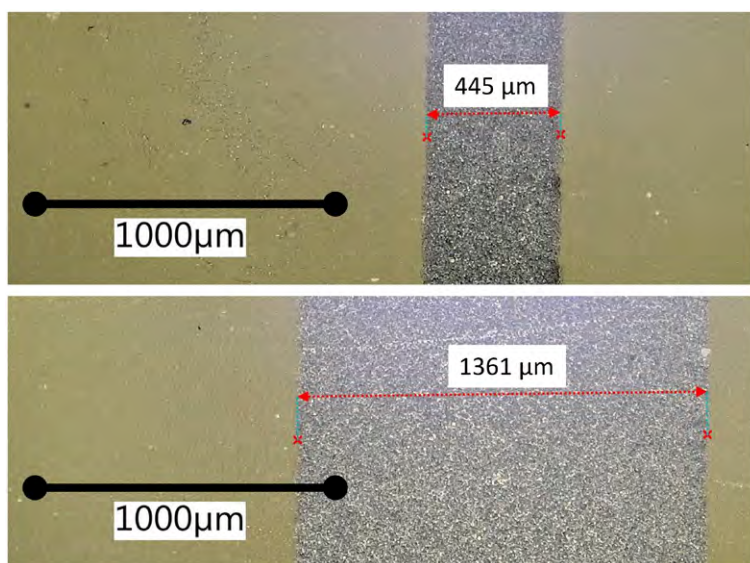
Warstwę chromonikieliny, stanowiącą rezystancyjny element grzejny, osadzono metodą rozpylania magnetronowego z wykorzystaniem urządzenia NANO 36™ firmy Kurt J. Lesker. Geometrię prostokątnych mikrogrzejników

uzyskano metodą maskowania przy użyciu taśmy kaptonowej, która osłaniała wybrane obszary podłoża przed procesem osadzania metalu (ryc. 4.16).

Przygotowano elementy grzejne o szerokościach w przedziale 445–1361  $\mu\text{m}$ , co pozwoliło na charakterystykę ich zachowań termicznych oraz elektrycznych. Wymiary cienkowarstwowych rezystorów zmierzono z wykorzystaniem mikroskopu VHX 5000 (ryc. 4.17).



**Ryc. 4.16.** Płytki drukowane zawierające mikrogrzejniki z chromonikieliny oraz ścieżki doprowadzające i pola kontaktowe z miedzi

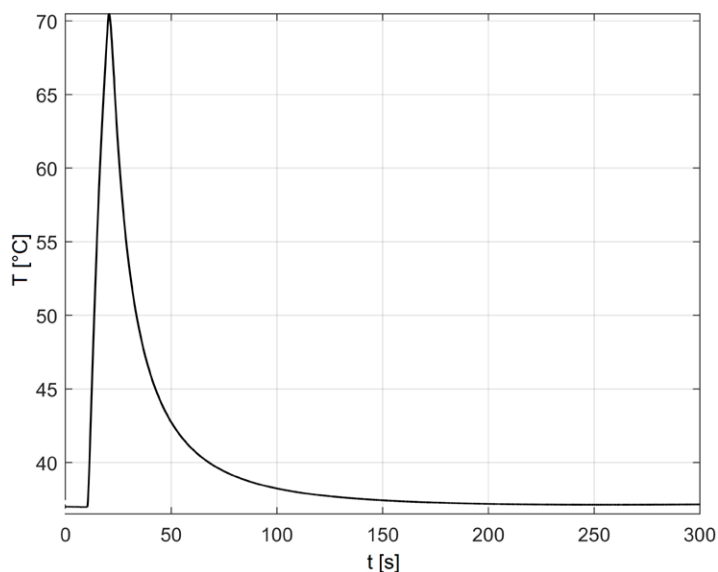


**Ryc. 4.17.** Najwęższy i najszerszy z wytworzonych mikrogrzejników z chromonikieliny o szerokościach odpowiednio: 445  $\mu\text{m}$  (u góry) i 1361  $\mu\text{m}$  (u dołu)

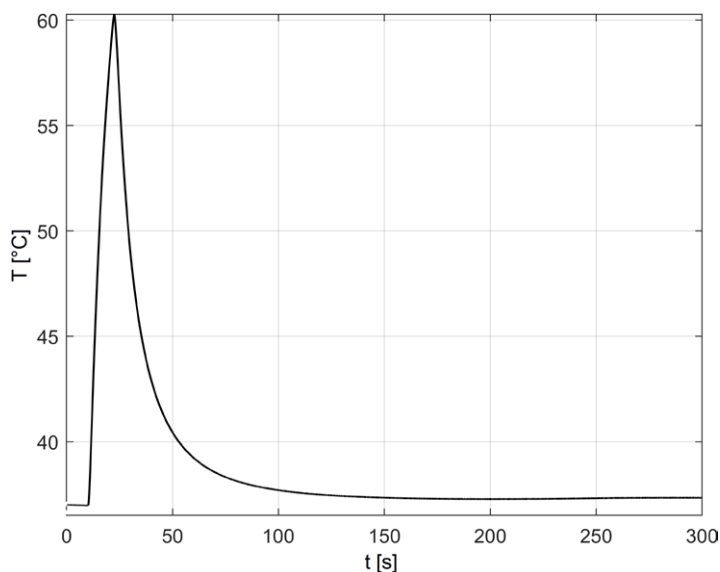
### 4.3.2. Dynamiczna praca grzejników

Dla grzejników z chromonikieliny wytworzonych na płycie drukowanej zaplanowano przeprowadzenie testowej hodowli komórek odzwierzęcych z krótkotrwałym włączeniem grzejnika w celu wywołania lokalnego uszkodzenia termicznego. Wymagało to ustalenia odpowiednich warunków zasilania podczas hodowli. W tym celu grzejniki zamocowano pod naczyniem hodowlanym wypełnionym wodą, a na jego dnie umieszczono czujnik temperatury Pt100, którego rezystancję mierzono za pomocą multimetru Keysight 34410A.

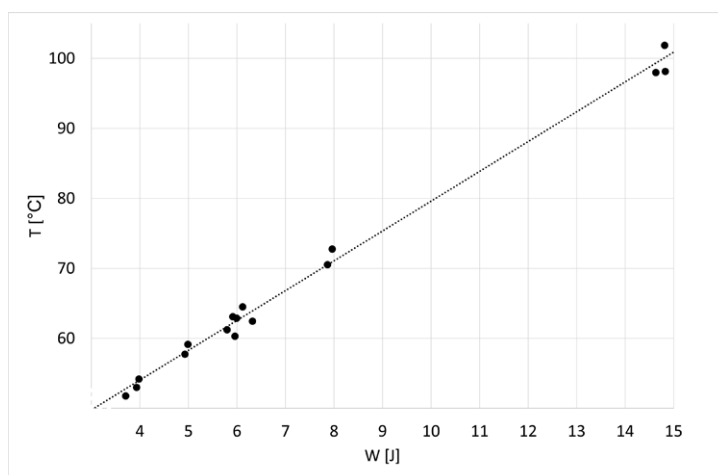
Po dziesięciu sekundach od rozpoczęcia monitorowania sygnału z czujnika Pt100 włączano zasilanie grzejnika na określony czas, a następnie je wyłączano, stale rejestrując temperaturę układu na dnie naczynia. Pomiar przebiegał w trybie automatycznym, sterowanym oprogramowaniem przygotowanym w środowisku Matlab. Do zasilania grzejników użyto programowalnego zasilacza Hameg 4040. Temperatura była rejestrowana co ok. 60 ms, co zapewniało odpowiednią dynamikę pomiaru reakcji układu (ryc. 4.18–4.19). Na podstawie zebranych danych pomiarowych sporządzono charakterystykę temperatury w funkcji energii dostarczonej do układu (ryc. 4.20).



**Ryc. 4.18.** Temperatura w funkcji czasu w układzie mikrogrzejnik – naczynie hodowlane podczas podgrzewania trwającego 10 s, dla mocy 0,79 W,  $T_{\max} = 70,50$  °C,  $R_{\text{grzejnika}} = 2460$   $\Omega$ ,  $U_{\text{zasilania}} = 44$  V



**Ryc. 4.19.** Temperatura w funkcji czasu w układzie mikrogrzejnik – naczynie hodowlane podczas podgrzewania trwającego 12 s, dla mocy 0,5 W,  $T_{\max} = 60,28$  °C,  $R_{\text{grzejnika}} = 2610$   $\Omega$ ,  $U_{\text{zasilania}} = 36$  V



**Ryc. 4.20.** Temperatura na dnie naczynia hodowlanego w funkcji energii dostarczonej do mikrogrzejnika z linią aproksymacji

Przeprowadzone pomiary umożliwiły zaplanowanie eksperymentów hodowli komórek *in vitro* z wykorzystaniem mikrogrzejników. Przyjęto wartości mocy w zakresie 0,33–1,66 W dostarczanej do układu w czasie 5–12 s. W tabeli 4.2 przedstawiono plan eksperymentów dla 8 mikrogrzejników umieszczonych pod podłożem pomiarowym ECIS. W kolumnach podano kolejno: numer eksperymentu, energię dostarczoną do układu, obliczoną moc, czas dostarczania energii, napięcie zasilające mikrogrzejnik, jego numer, rezystancję oraz umowny czas od dodania komórek do naczynia hodowlanego.

**Tabela 4.2.** Plan eksperymentów nr 1–8 z hodowlą komórkową z wykorzystaniem przetworników impedancyjnych i mikrogrzejników

| Lp. | Energia [J] | Moc [W] | Czas grzania [s] | Napięcie zasilające [V] | Nr mikrogrzejnika | Rezystancja mikrogrzejnika [ $\Omega$ ] | Czas od rozpoczęcia hodowli [h:min:s] |
|-----|-------------|---------|------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| 1   | 2,5         | 0,499   | 5                | 55,2                    | 3                 | 6100                                    | 48:43:34                              |
| 2   | 4,0         | 0,335   | 12               | 28,4                    | 8                 | 2410                                    | 48:35:02                              |
| 3   | 5,0         | 0,455   | 11               | 33,2                    | 1                 | 2420                                    | 48:36:21                              |
| 4   | 6,1         | 0,607   | 10               | 38,4                    | 6                 | 2430                                    | 48:37:20                              |
| 5   | 7,0         | 0,773   | 9                | 43,6                    | 5                 | 2460                                    | 48:38:28                              |
| 6   | 8,0         | 1,004   | 8                | 51,2                    | 4                 | 2610                                    | 48:40:00                              |
| 7   | 9,1         | 1,294   | 7                | 69,2                    | 2                 | 3700                                    | 48:41:07                              |
| 8   | 10,0        | 1,665   | 6                | 95,6                    | 7                 | 5490                                    | 48:42:33                              |

Podłoże ECIS 8W10E

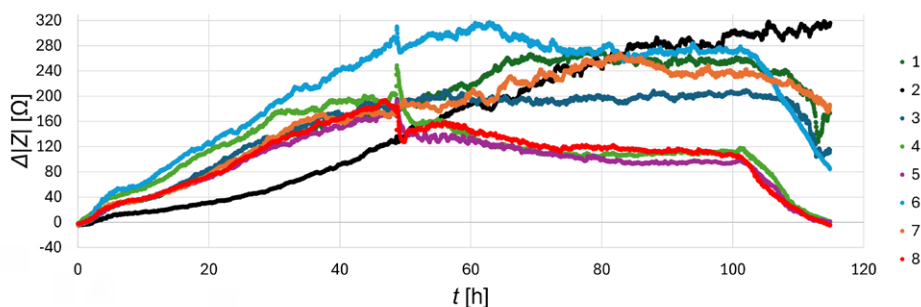
Stacja bazowa

Podłoże z mikrogrzejnikami

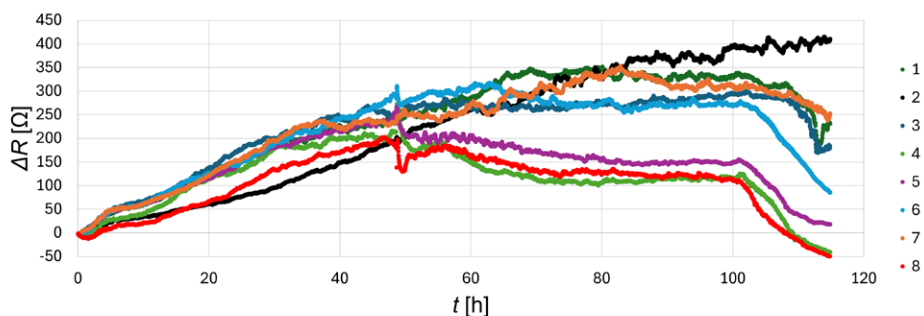
114

Wyniki pomiarów wskazują, że w czasie 114 godzin komórki fibroblastów mysich przeszły typowy, pełny cykl życia, obejmujący etap adhezji, namnażanie, stabilizację oraz obumarcie. Na wykresach zmierzonych parametrów elektrycznych sporządzonych dla typowych częstotliwości sygnału widoczny jest moment włączania mikrogrzejnika dostarczającego ciepło do układu (ryc. 4.22–4.24). Około 50. godziny trwania hodowli zachodzą wyraźne dynamiczne zmiany wartości każdego z mierzonych parametrów, co oznacza gwałtowną reakcję komórek na pojawienie się wysokiej temperatury. Komórki traciły adhezję do podłoża i odrywały się od niego. Zbyt wysoka temperatura powodowała również uśmiercenie komórek – część z nich pozostała na podłożu, tworząc barierę dla żywych komórek wykazujących tendencję do migracji w miejsce po oparzeniu. Jednocześnie można zaobserwować, że lokalne podniesienie temperatury nie uśmierciło całej hodowli, czyli temperatura pożywki nie wzrosła powyżej wartości krytycznej dla komórek niebędących w zasięgu powierzchni grzewczej rezystora.

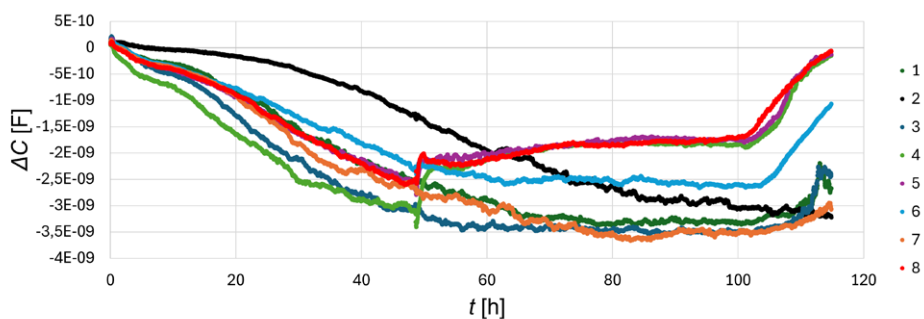
Charakter zmian obserwowanych na wykresach zmierzonej impedancji oraz rezystancji (ryc. 4.22–4.23) jest bardzo zbliżony. W związku z tym wyniki uzyskane dla wszystkich ośmiu naczyń hodowlanych przedstawiono w postaci wykresów rezystancji i pojemności oraz obrazów mikroskopowych dna naczyń wykonanych w dniu zakończenia hodowli.



**Ryc. 4.22.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 114 h (dla  $f = 16$  kHz) w eksperymentach 1–8, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 48$  h 35 min



**Ryc. 4.23.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 114 h (dla  $f = 4$  kHz) w eksperymentach 1–8, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 48$  h 35 min



**Ryc. 4.24.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 114 h dla ( $f = 64$  kHz) w eksperymentach 1–8, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 48$  h 35 min

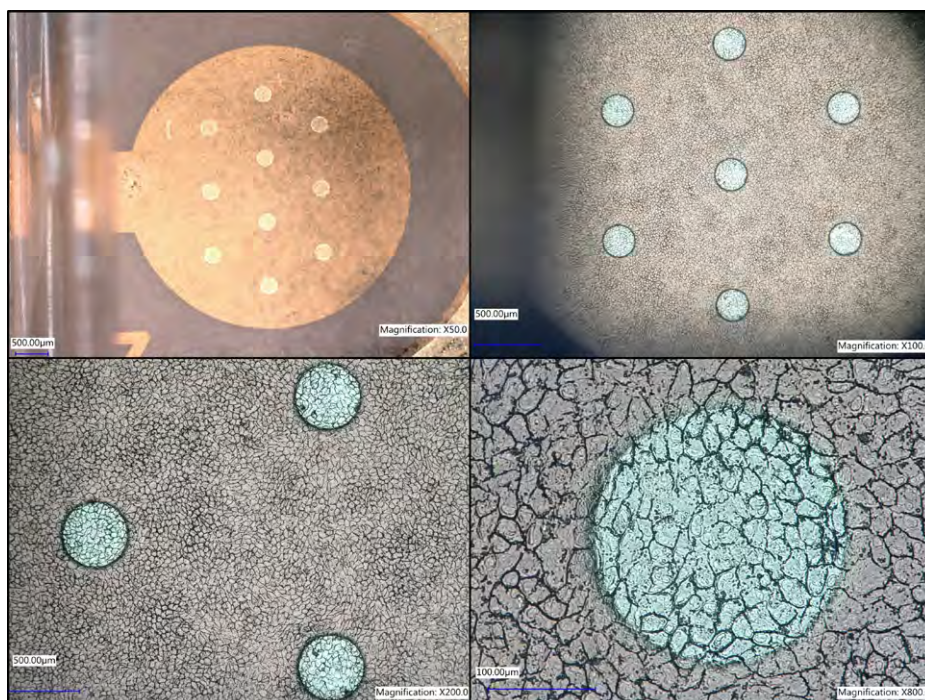
Wyniki eksperymentów nr 1–8, obejmujące odpowiedź elektryczną na aktywację mikrogrzejnika oraz stan monowarstwy komórkowej po zakończeniu hodowli, zestawiono w tabeli 4.3.

**Tabela 4.3.** Wyniki eksperymentów nr 1–8

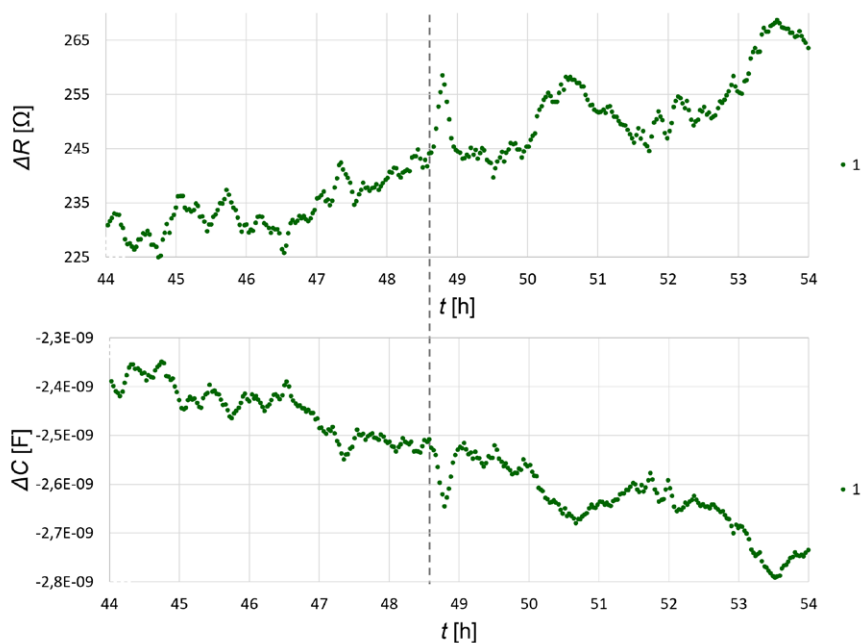
| Lp. | Nr mikro-grzejnika | Stan monowarstwy po zakończeniu hodowli                                                                       | Odpowiedź elektryczna na aktywację mikrogrzejnika                                                                                                                        |
|-----|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | 3                  | Ciągła, jednorodna (ryc. 4.25)                                                                                | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; powrót do poziomu sprzed aktywacji i kontynuacja pierwotnego trendu zmian (ryc. 4.26)                                                   |
| 2   | 8                  | Ciągła, jednorodna (ryc. 4.27)                                                                                | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; powrót do poziomu sprzed aktywacji i kontynuacja pierwotnego trendu zmian (ryc. 4.28)                                                   |
| 3   | 1                  | Ciągła, jednorodna (ryc. 4.29)                                                                                | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; powrót do poziomu sprzed aktywacji; przejście do odmiennego trendu zmian (ryc. 4.30)                                                    |
| 4   | 6                  | Trwałe uszkodzenie monowarstwy; brak regeneracji (ryc. 4.31)                                                  | Gwałtowna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż występowały przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.32) |
| 5   | 5                  | Trwałe uszkodzenie monowarstwy; brak regeneracji (ryc. 4.33)                                                  | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż występowały przed aktywacją grzejnika; przejście do odmiennego trendu zmian (ryc. 4.34)   |
| 6   | 4                  | Trwałe uszkodzenie monowarstwy; brak regeneracji (ryc. 4.35)                                                  | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż występowały przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.36)   |
| 7   | 2                  | Mikrogrzejnik uległ uszkodzeniu na skutek przepalenia ścieżki rezystywnej elementu grzejnego (ryc. 4.37–4.38) |                                                                                                                                                                          |
| 8   | 7                  | Trwałe uszkodzenie monowarstwy; brak regeneracji (ryc. 4.39)                                                  | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż występowały przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.40)   |

W toku eksperymentów nr 1–3 po dostarczeniu do naczynia energii z zakresu 2,5–5 J zaobserwowano wyraźne zmiany wartości rezystancji i pojemności w momencie włączenia mikrogrzejnika, co może wskazywać na czasową utratę adhezji komórek do podłoża. Jednocześnie obrazy mikroskopowe wykonane po zakończeniu eksperymentu potwierdzają, że w obszarze poddanym oddziaływaniu termicznemu monowarstwa komórkowa uległa w tych przypadkach pełnej regeneracji (ryc. 4.25–4.30). Taki wynik można uznać za najbardziej oczekiwany, gdyż wskazuje na powstanie przejściowego uszkodzenia monowarstwy w trakcie aktywacji mikrogrzejnika przy jednoczesnym zachowaniu zdolności komórek do regeneracji.

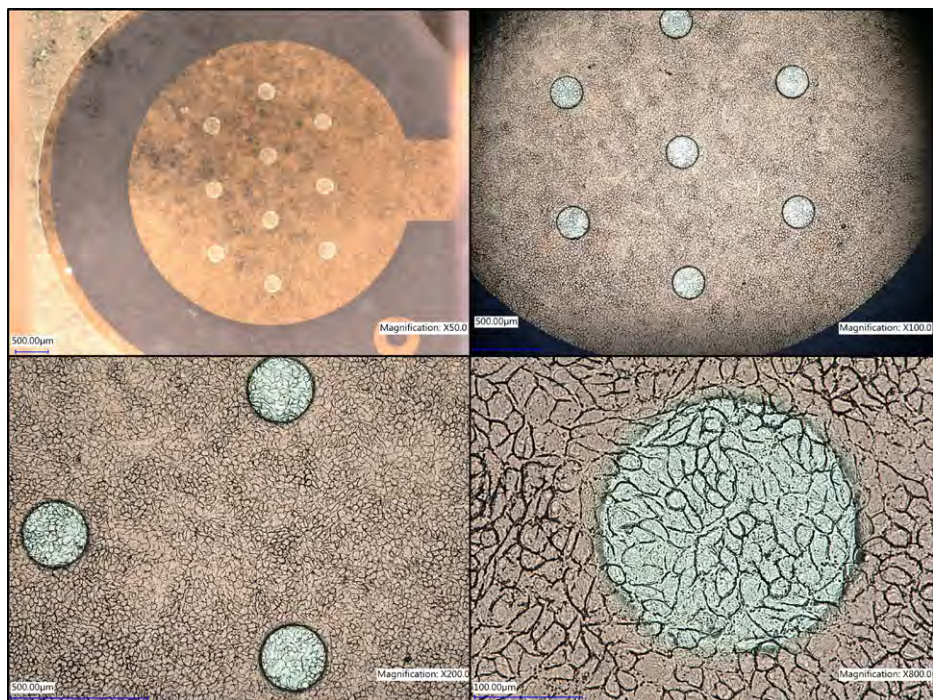
W eksperymentach nr 4–6 oraz 8, w których dostarczono energię z zakresu 6,1–10 J, stwierdzono trwałe uszkodzenie obszaru monowarstwy komórkowej w obszarze oddziaływania termicznego. Komórki obumarły, tworząc barierę z martwych komórek, która ograniczyła lub uniemożliwiła proces regeneracji. Uszkodzenia te były nadal widoczne na obrazach mikroskopowych wykonanych po zakończeniu hodowli (ryc. 4.31, 4.33, 4.35, 4.39).



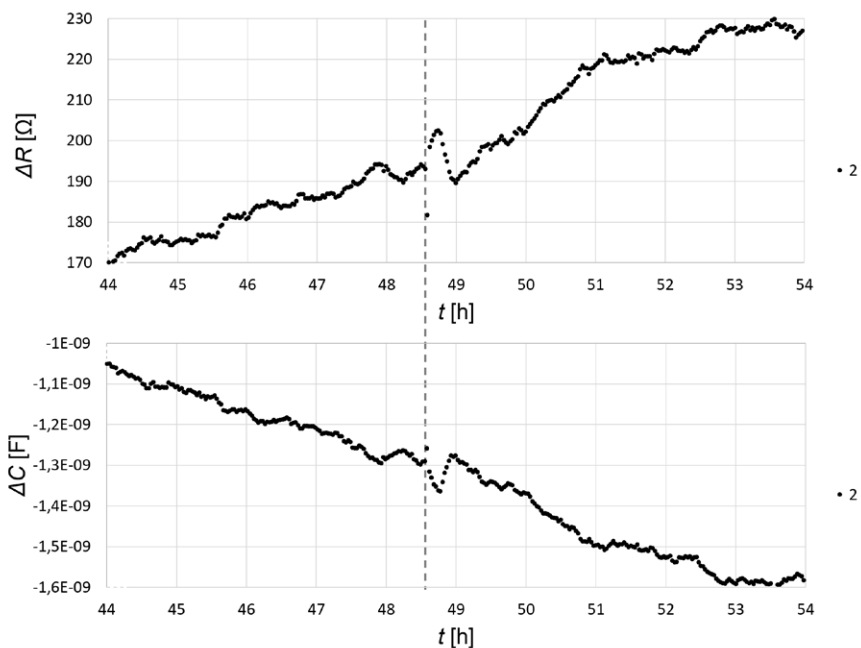
**Ryc. 4.25.** Dno naczynia po eksperymencie nr 1 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800×



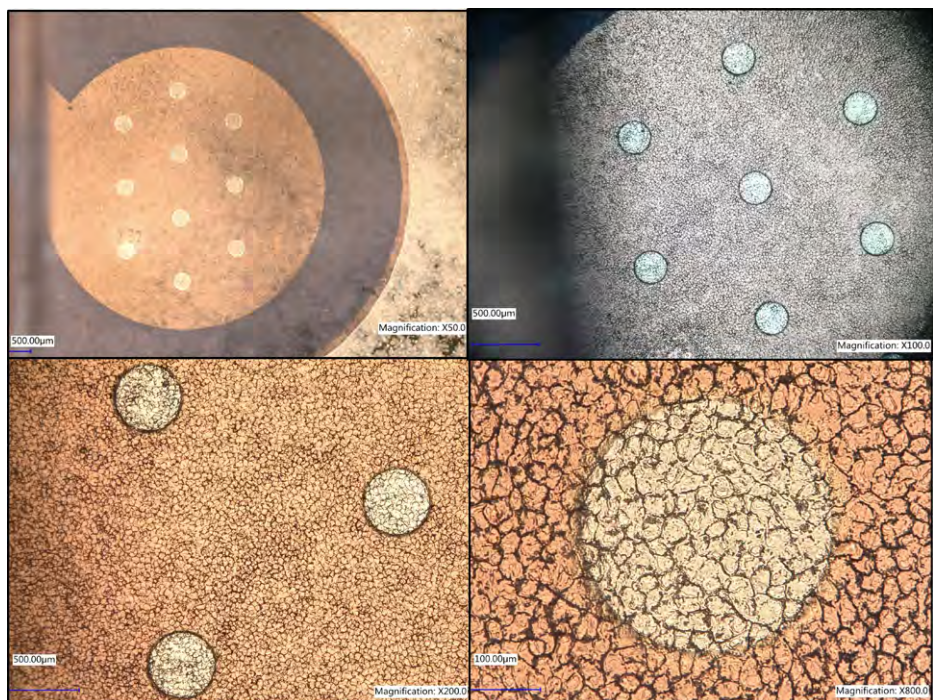
**Ryc. 4.26.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 1; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 43 min (oznaczony linią przerywaną)



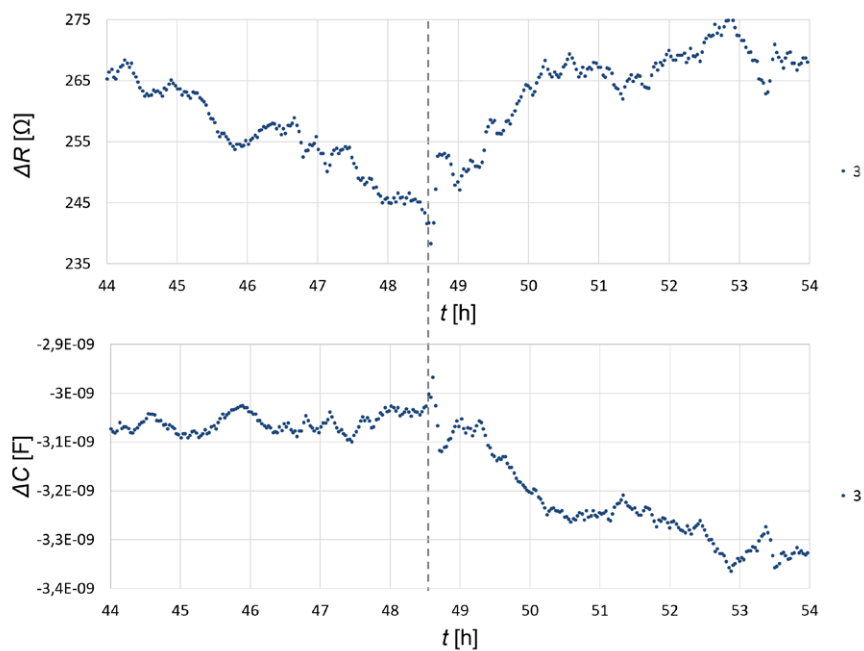
**Ryc. 4.27.** Dno naczynia po eksperymencie nr 2 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800x



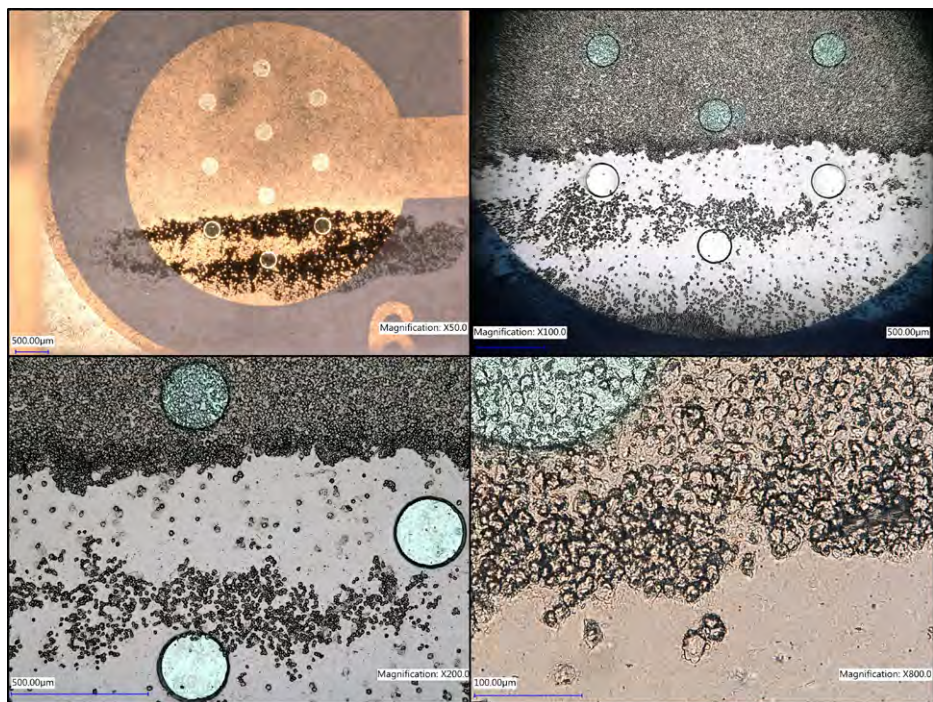
**Ryc. 4.28.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 2; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 35 min (oznaczony linią przerywaną)



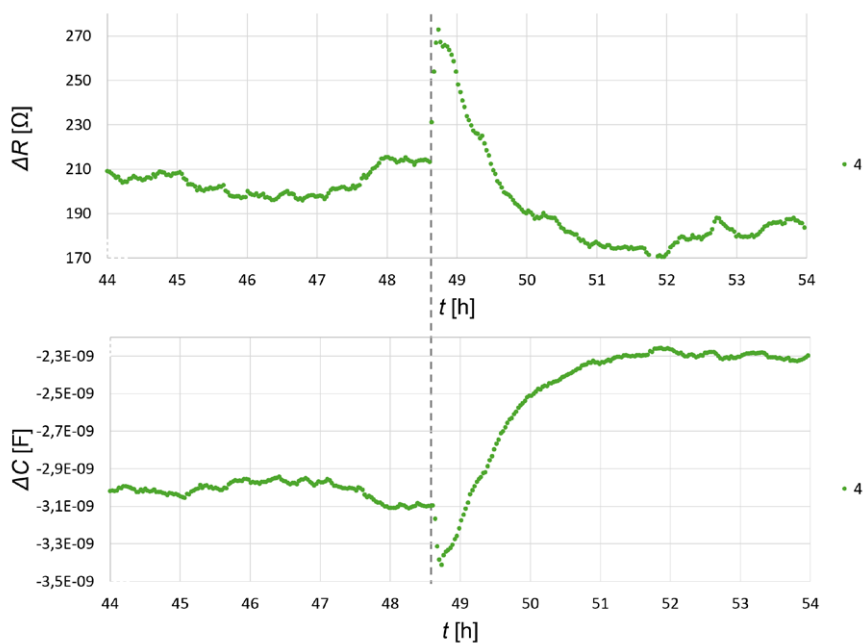
**Ryc. 4.29.** Dno naczynia po eksperymencie nr 3 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800x



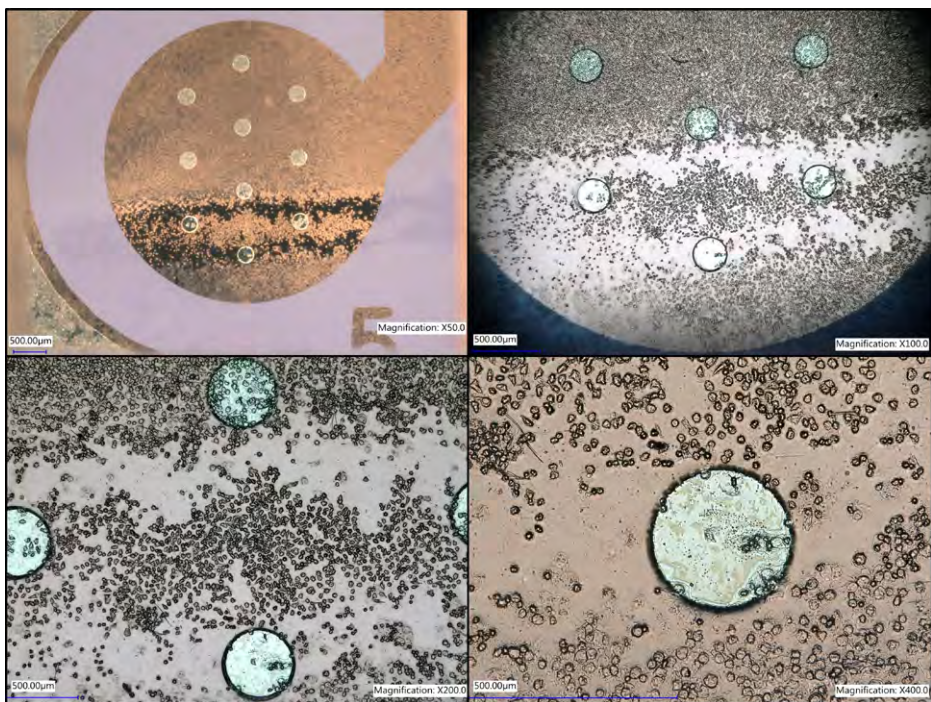
**Ryc. 4.30.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 3; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 36 min (oznaczony linią przerywaną)



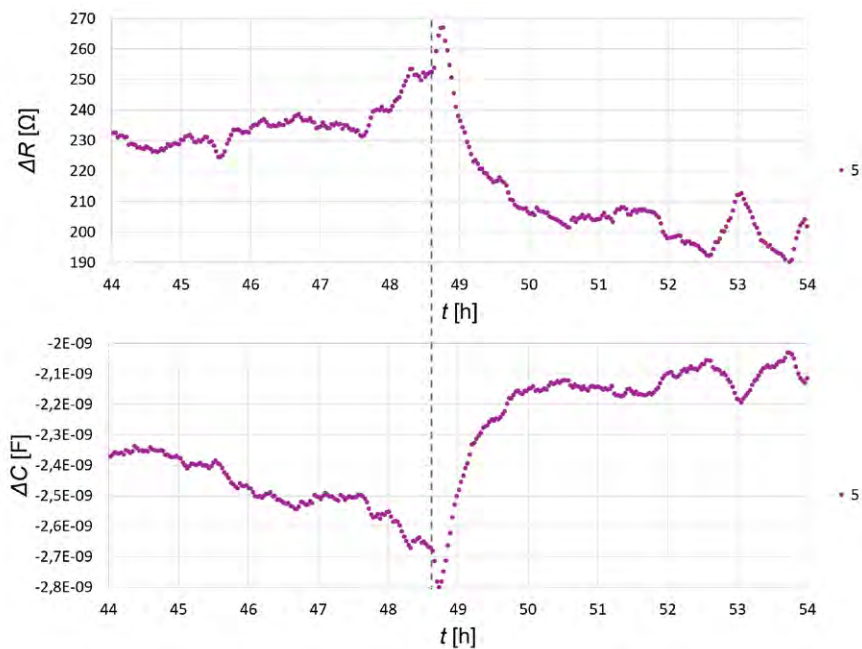
**Ryc. 4.31.** Dno naczynia po eksperymencie nr 4 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800x



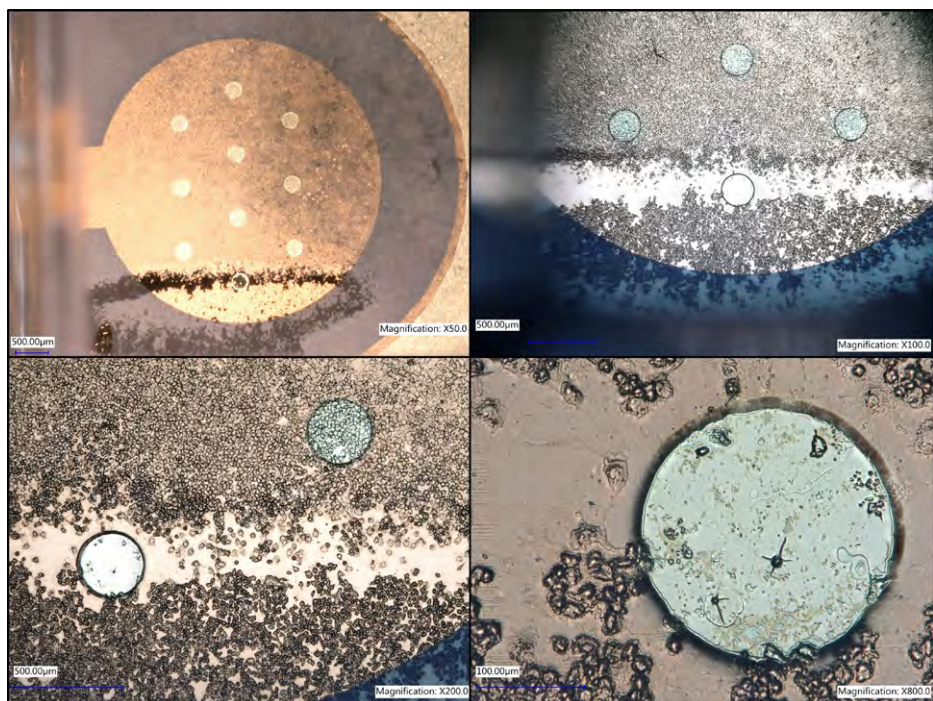
**Ryc. 4.32.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 4; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 37 min (oznaczony linią przerywaną)



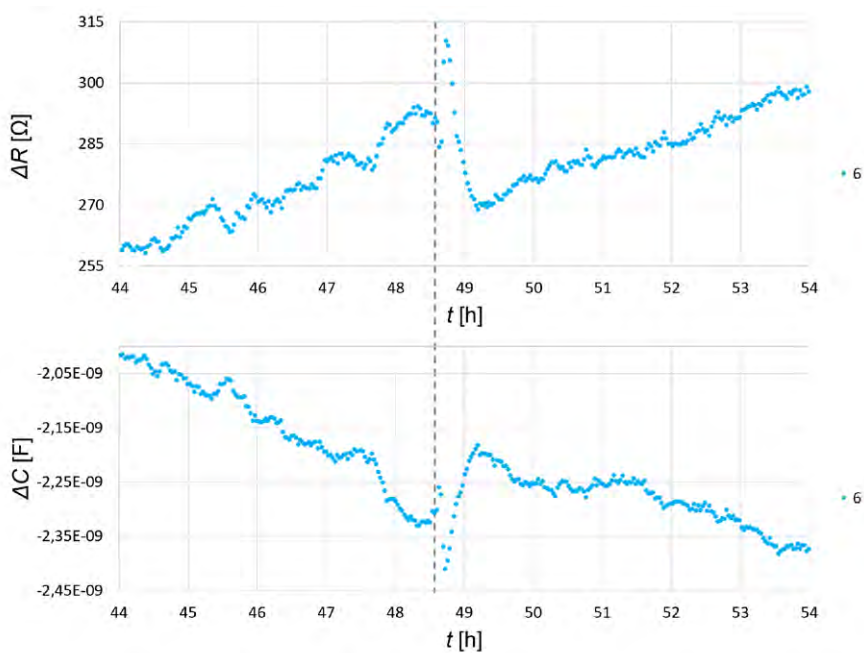
**Ryc. 4.33.** Dno naczynia po eksperymencie nr 5 w powiększeniach 50, 100, 200 i 400x



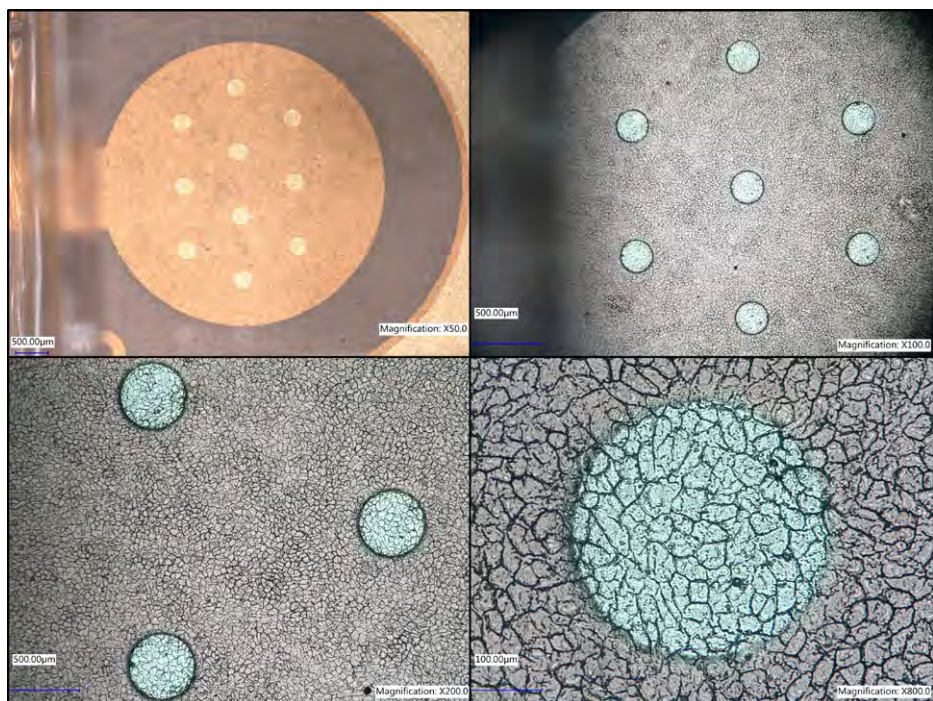
**Ryc. 4.34.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 5; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 38 min (oznaczony linią przerywaną)



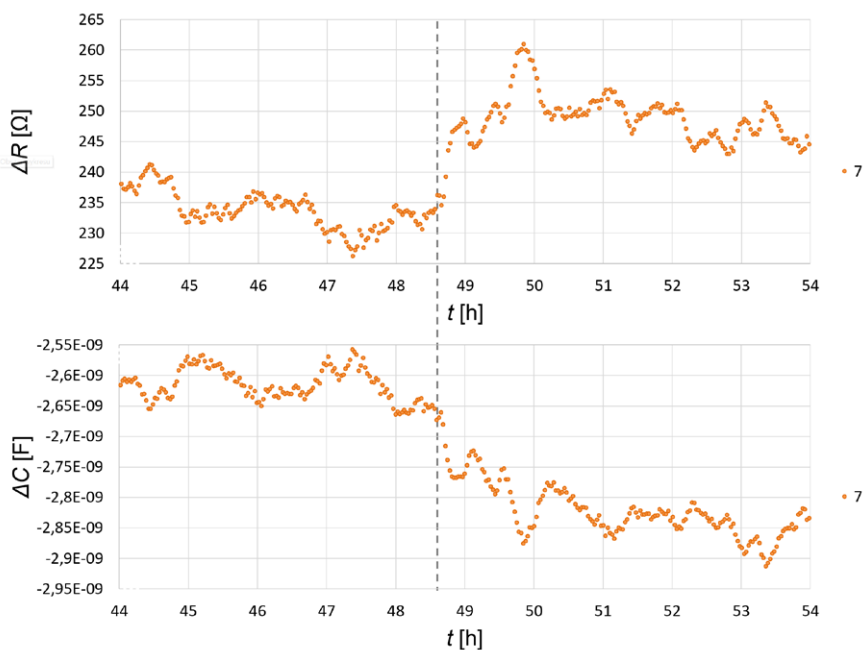
**Ryc. 4.35.** Dno naczynia po eksperymencie nr 6 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800x



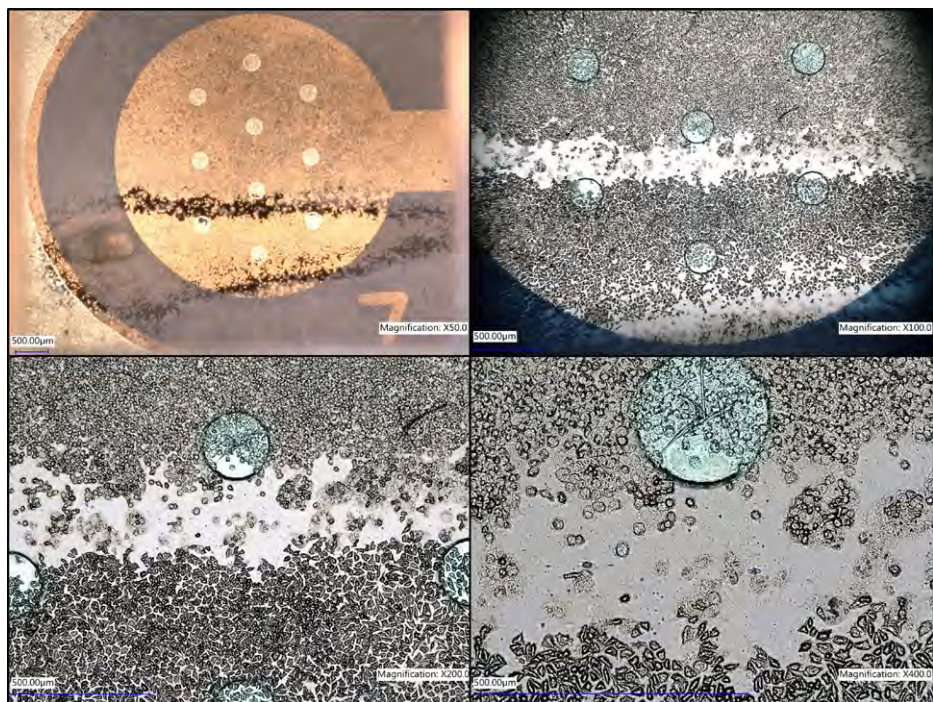
**Ryc. 4.36.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 6; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 40 min (oznaczony linią przerywaną)



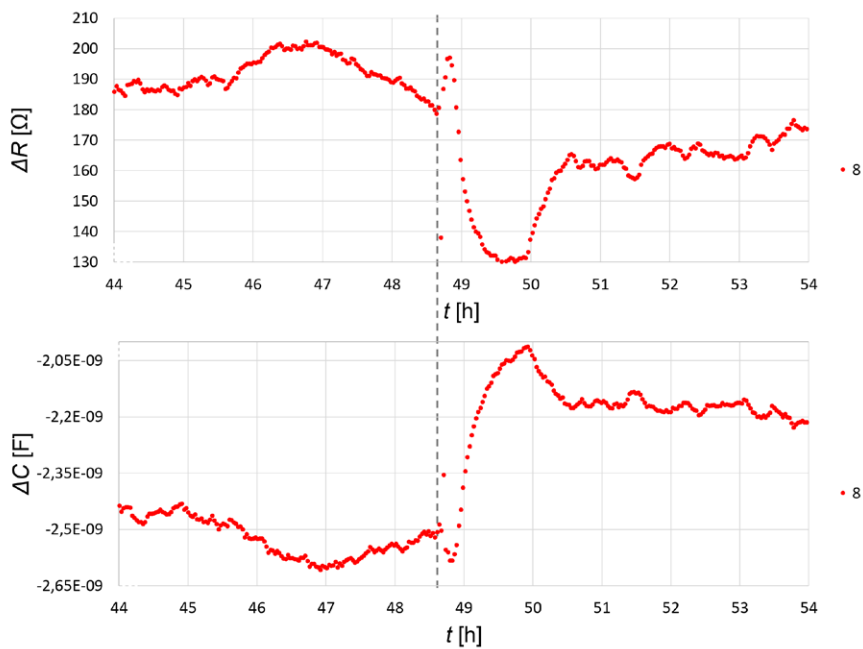
**Ryc. 4.37.** Dno naczynia po eksperymencie nr 7 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800x



**Ryc. 4.38.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 7; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 41 min (oznaczony linią przerywaną)



**Ryc. 4.39.** Dno naczynia po eksperymencie nr 8 w powiększeniach 50, 100, 200 i 400x



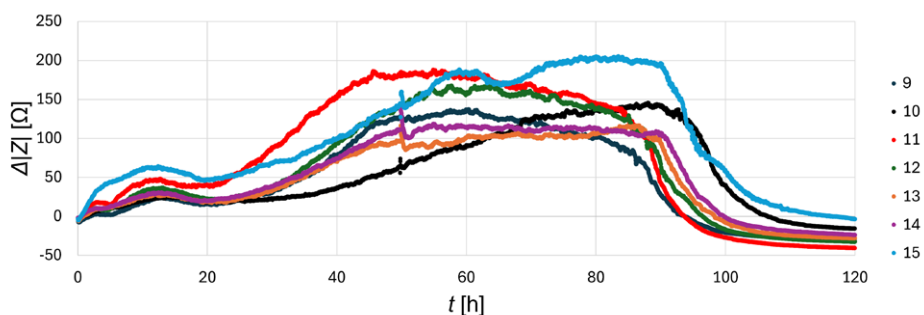
**Ryc. 4.40.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 8; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 48$  h 42 min (oznaczony linią przerywaną)

Hodowlę komórkową powtórzono dwukrotnie z wykorzystaniem tej samej linii komórkowej, identycznego układu pomiarowego oraz podłoża z mikrogrzejnikami przy zachowaniu niezmiennych warunków środowiskowych. Podłoże jednorazowego użytku 8W10E zostało wymienione na nowe. Szczegółowy harmonogram eksperymentów nr 9–15 zestawiono w tabeli 4.4. W trakcie hodowli komórkowej do naczyń dostarczano energię z zakresu 5,25–12,11 J, przy czasie aktywacji mikrogrzejnika wynoszącym 5–12 s.

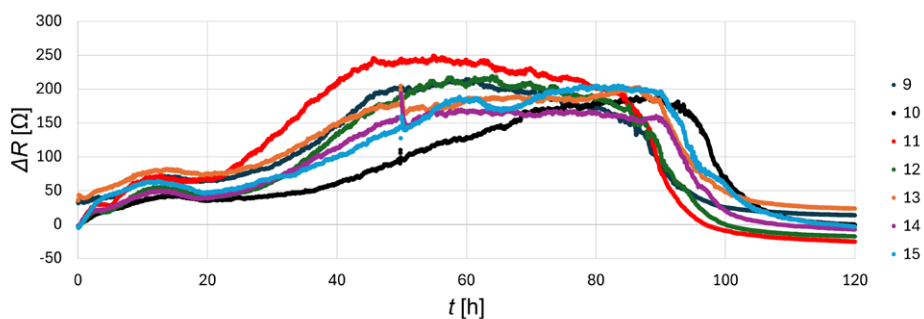
**Tabela 4.4.** Plan eksperymentów nr 9–15

| Lp. | Energia [J] | Moc [W] | Czas grzania [s] | Napięcie zasilające [V] | Nr mikrogrzejnika | Rezystancja mikrogrzejnika [ $\Omega$ ] | Czas od rozpoczęcia hodowli [h:min:s] |
|-----|-------------|---------|------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| 9   | 5,25        | 1,049   | 5                | 80                      | 7                 | 5490                                    | 49:54:53                              |
| 10  | 5,89        | 0,536   | 11               | 36                      | 8                 | 2410                                    | 49:47:24                              |
| 11  | 6,07        | 0,607   | 10               | 38,4                    | 1                 | 2420                                    | 49:48:26                              |
| 12  | 6,45        | 0,538   | 12               | 36                      | 3                 | 6100                                    | 49:46:14                              |
| 13  | 6,95        | 0,773   | 9                | 43,6                    | 6                 | 2430                                    | 49:49:34                              |
| 14  | 11,03       | 1,379   | 8                | 60                      | 5                 | 2460                                    | 49:50:43                              |
| 15  | 12,11       | 1,730   | 7                | 80                      | 4                 | 2610                                    | 49:51:42                              |

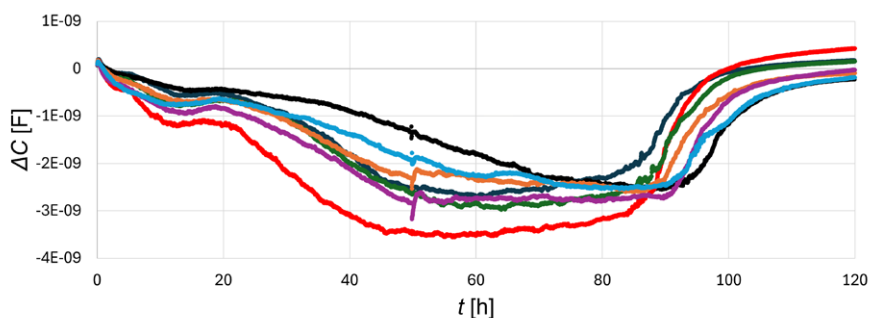
Podczas hodowli w ciągu 120 godzin komórki we wszystkich naczyniach przeszły pełny, prawidłowy cykl rozwoju. Charakter zmian mierzonych parametrów elektrycznych (ryc. 4.41–4.43) był zgodny z oczekiwanym wzorcem oraz z wynikami uzyskanymi w poprzednich seriach eksperymentalnych. Około 50. godziny od rozpoczęcia hodowli, pod koniec fazy formowania się monowarstwy komórkowej, włączano zasilanie mikrogrzejników, powodując lokalne podwyższenie temperatury w obszarze hodowli. Po zakończeniu eksperymentów wykonano obrazy mikroskopowe dna każdego naczynia hodowlanego w celu oceny stanu monowarstwy komórkowej.



**Ryc. 4.41.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 120 h (dla  $f = 16$  kHz) w eksperymentach 9–15, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 49$  h 46 min



**Ryc. 4.42.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 120 h (dla  $f = 4$  kHz) w eksperymentach 9–15, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 49$  h 46 min



**Ryc. 4.43.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 120 h (dla  $f = 64$  kHz) w eksperymentach 9–15, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 49$  h 46 min

Wyniki eksperymentów nr 9–15, obejmujące odpowiedź elektryczną układu na aktywację mikrogrzejnika oraz stan monowarstwy komórkowej po zakończeniu hodowli zestawiono w tabeli 4.5.

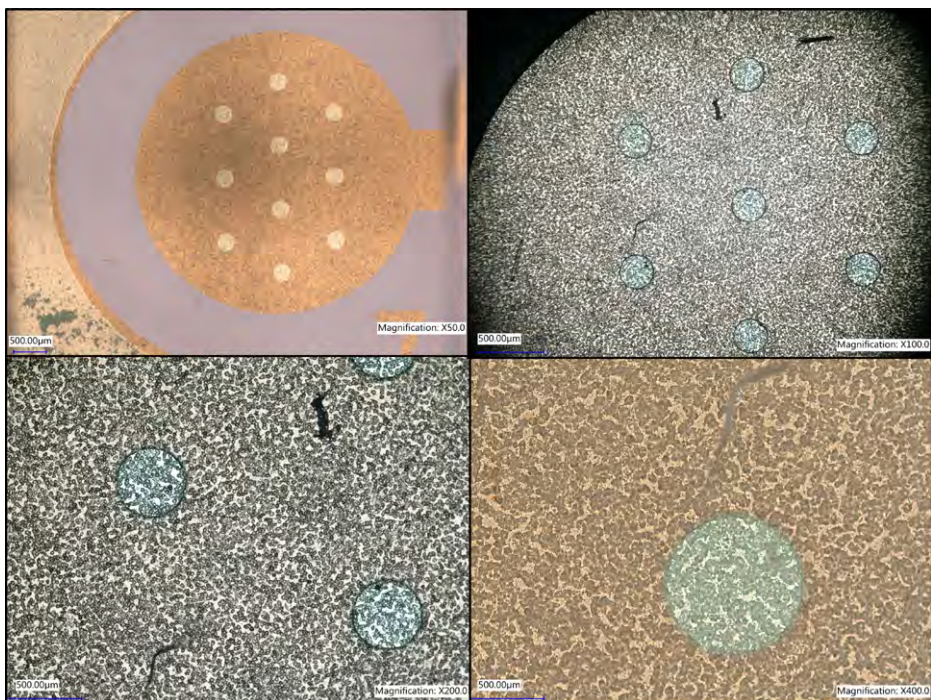
**Tabela 4.5.** Wyniki eksperymentów nr 9–15

| Lp. | Nr mikrogrzejnika | Stan monowarstwy po zakończeniu hodowli                                                                                                  | Odpowiedź elektryczna na aktywację mikrogrzejnika                                                                                                                        |
|-----|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9   | 7                 | Brak obserwowalnych zmian; mikrogrzejnik uległ uszkodzeniu na skutek przepalenia ścieżki rezystywnej elementu grzejnego (ryc. 4.44–4.45) |                                                                                                                                                                          |
| 10  | 8                 | Ciągła, jednorodna (ryc. 4.46)                                                                                                           | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; powrót do poziomu sprzed aktywacji i kontynuacja pierwotnego trendu zmian (ryc. 4.47)                                                   |
| 11  | 1                 | Ciągła, jednorodna (ryc. 4.48)                                                                                                           | Niewielka, krótkotrwała zmiana $R$ , $C$ i $Z$ (ryc. 4.49)                                                                                                               |
| 12  | 3                 | Brak obserwowalnych zmian; mikrogrzejnik uległ uszkodzeniu na skutek przepalenia ścieżki rezystywnej elementu grzejnego (ryc. 4.50–4.51) |                                                                                                                                                                          |
| 13  | 6                 | Trwałe uszkodzenie monowarstwy; brak regeneracji (ryc. 4.52)                                                                             | Gwałtowna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż występowały przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.53) |
| 14  | 5                 | W uszkodzonym obszarze pozostały obumarłe komórki, brak regeneracji (ryc. 4.54)                                                          | Gwałtowna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż występowały przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.55) |
| 15  | 4                 | W uszkodzonym obszarze pozostały obumarłe komórki, brak regeneracji (ryc. 4.56)                                                          | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż występowały przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.57)   |

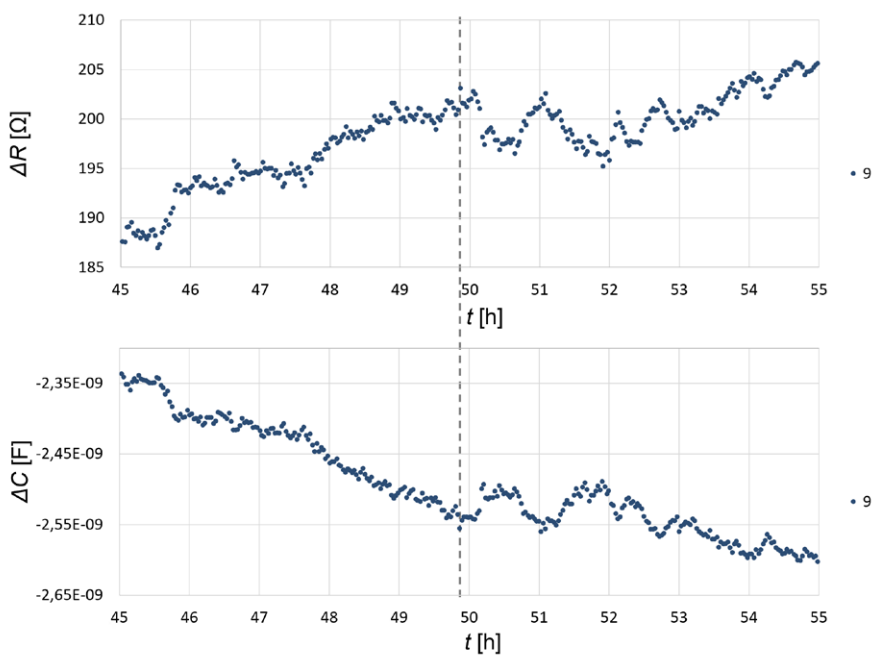
W eksperymencie nr 10 do naczynia hodowlanego dostarczono energię 5,89 J w czasie 11 s. Obrazy mikroskopowe wykonane po zakończeniu eksperymentu potwierdzają, że w tym przypadku monowarstwa komórkowa w obszarze poddanym oddziaływaniu termicznemu pozostała jednorodna (ryc. 4.46), a zarazem na wykresach rezystancji i pojemności zaobserwowano wyraźne zmiany ich wartości w momencie włączenia mikrogrzejnika (ryc. 4.47). Wartości mierzonych parametrów w ciągu kilkudziesięciu minut powróciły do poziomu sprzed aktywacji oddziaływania termicznego, a następnie kontynuowały pierwotny trend zmian. Takie zachowanie jest charakterystyczne dla wystąpienia czasowego uszkodzenia monowarstwy, po którym następuje jej regeneracja.

W eksperymencie nr 11 dostarczono energię 6,08 J w czasie 10 s. Odnotowano niewielką, krótkotrwałą zmianę parametrów elektrycznych. Analiza obrazów mikroskopowych po zakończeniu hodowli wykazała, że monowarstwa komórkowa pozostała ciągła i jednorodna (ryc. 4.48–4.49).

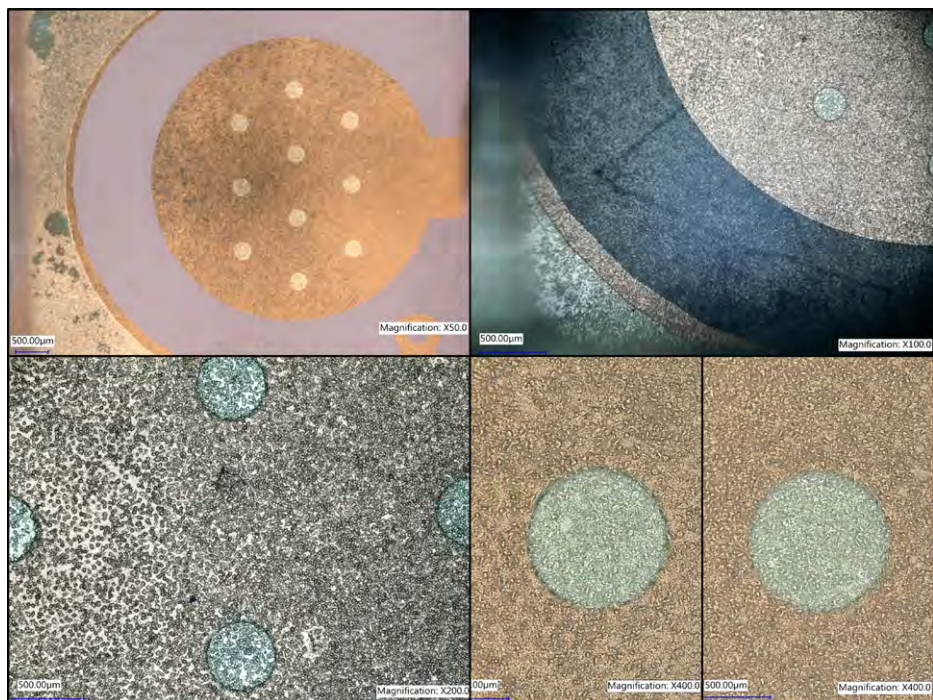
W eksperymentach nr 13–15, dla których dostarczono energię z zakresu 6,95–12,11 J, stwierdzono gwałtowną zmianę wartości rezystancji, pojemności i impedancji, po której nastąpił powrót do odmiennych poziomów sprzed aktywacji mikrogrzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu zmian. Analiza obrazów mikroskopowych wykonanych po zakończeniu hodowli ujawniła trwałe, morfologiczne uszkodzenia monowarstwy komórkowej w miejscach oddziaływania mikrogrzejników. Obszary te charakteryzowały się wyraźnym ubytkiem żywych komórek i nagromadzeniem szczątków komórkowych. Powstała w ten sposób bariera z martwych komórek skutecznie zahamowała lub całkowicie uniemożliwiła proces regeneracji uszkodzonego obszaru przez komórki z otaczającej, żywej monowarstwy (ryc. 4.52–4.57).



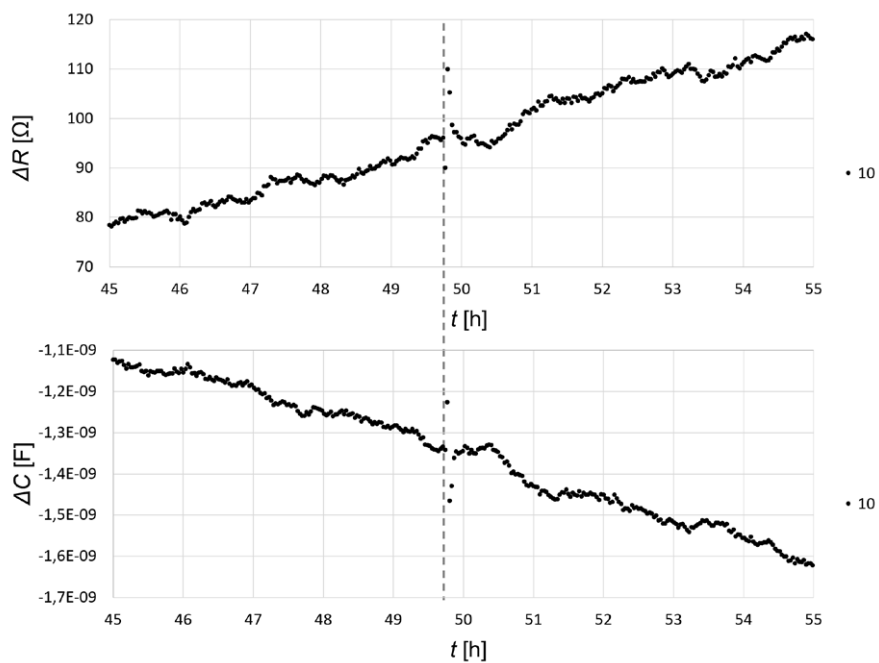
**Ryc. 4.44.** Dno naczynia po eksperymencie nr 9 w powiększeniach 50, 100, 200 i 400x



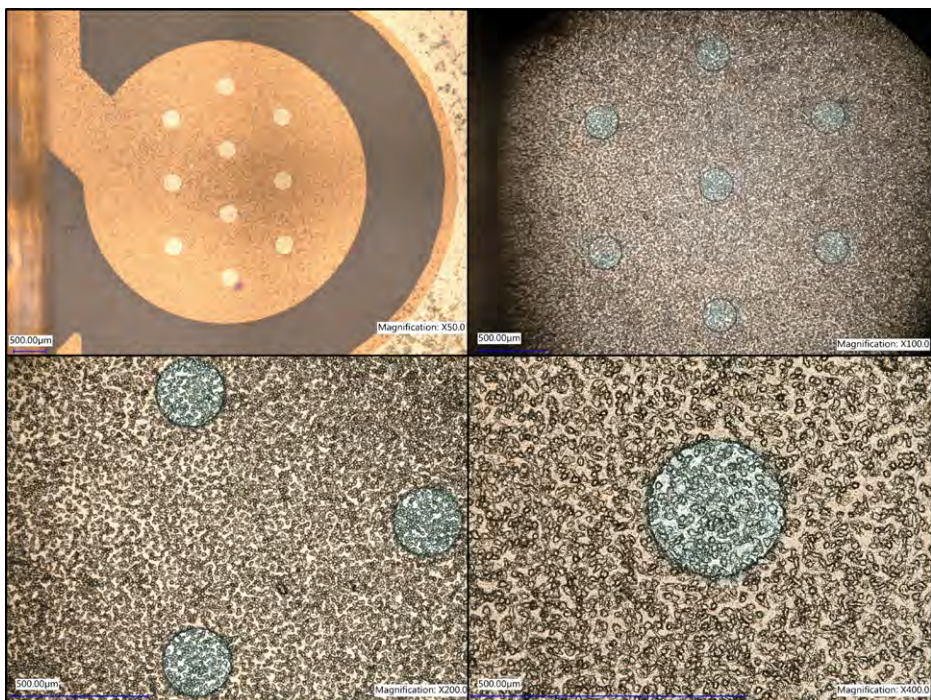
**Ryc. 4.45.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 9; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 49$  h 54 min (oznaczony linią przerywaną). Brak obserwowalnych zmian po aktywacji grzejnika wynika z uszkodzenia elementu grzejnego



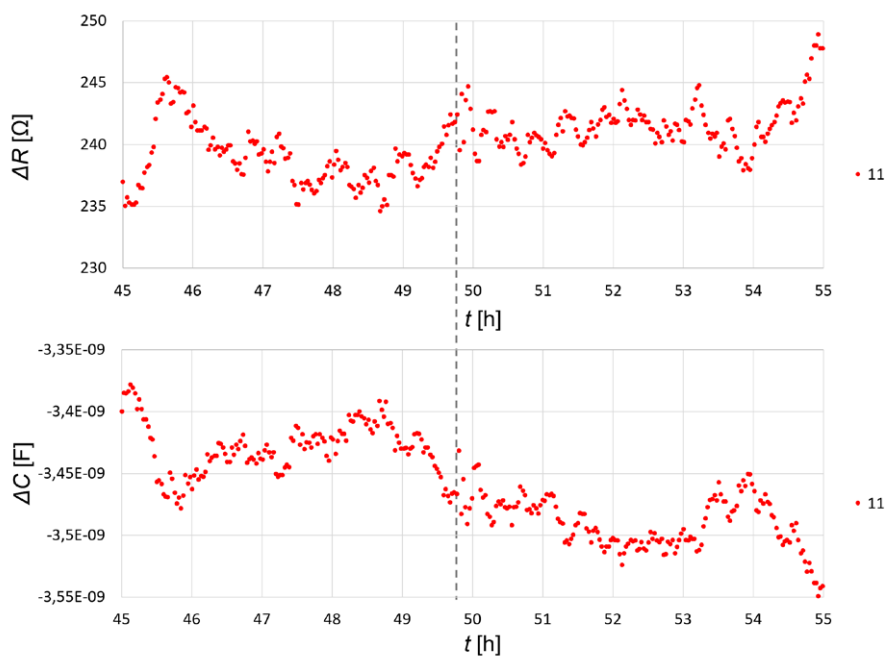
**Ryc. 4.46.** Dno naczynia po eksperymencie nr 10 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800×



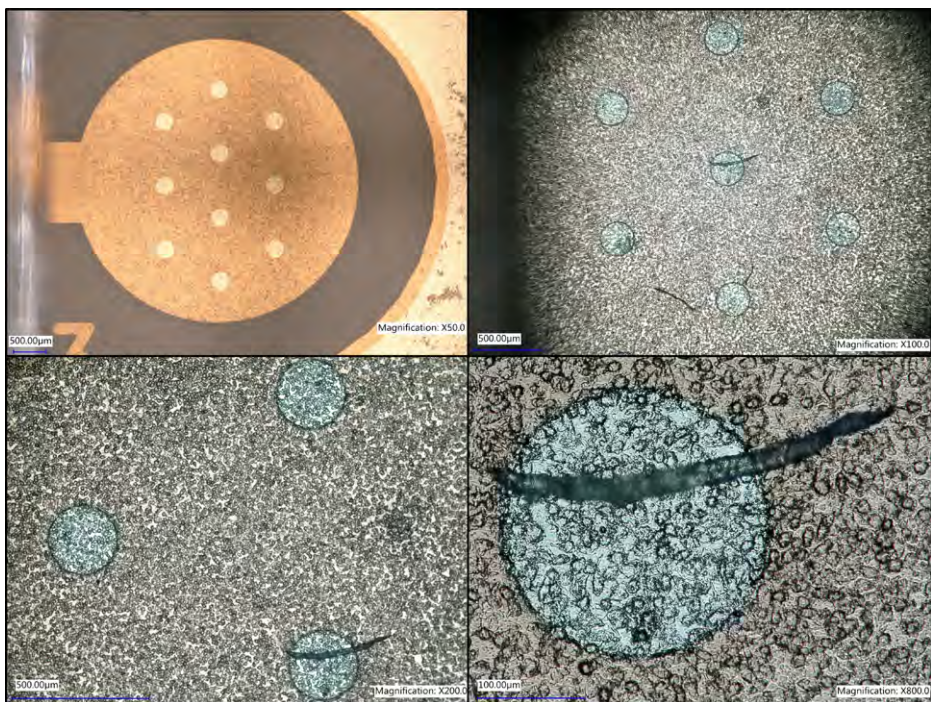
**Ryc. 4.47.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 10; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 49$  h 47 min (oznaczony linią przerywaną)



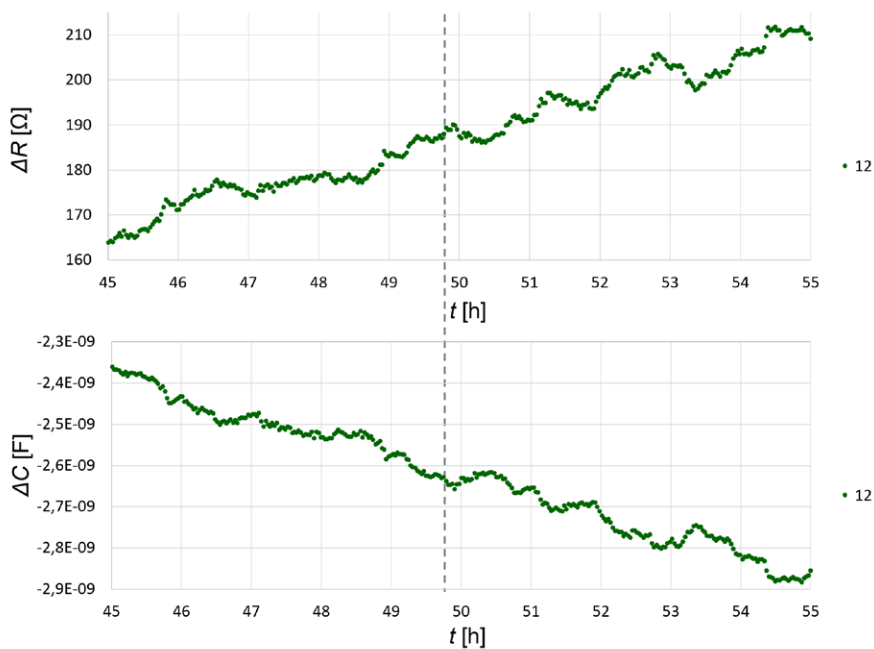
**Ryc. 4.48.** Dno naczynia po eksperymencie nr 11 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800×



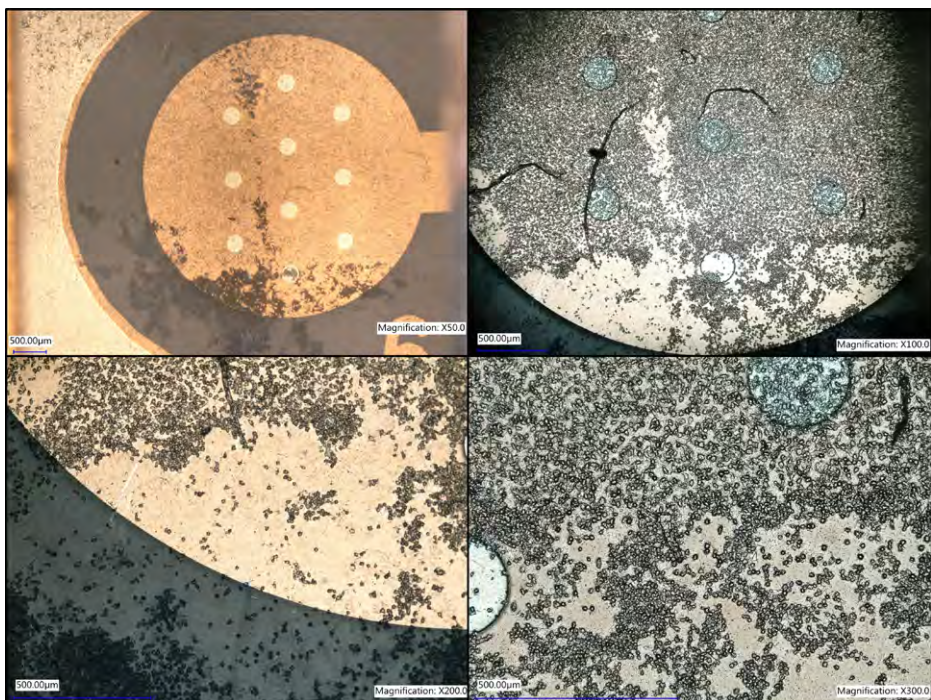
**Ryc. 4.49.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 11; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 49$  h 48 min (oznaczony linią przerywaną)



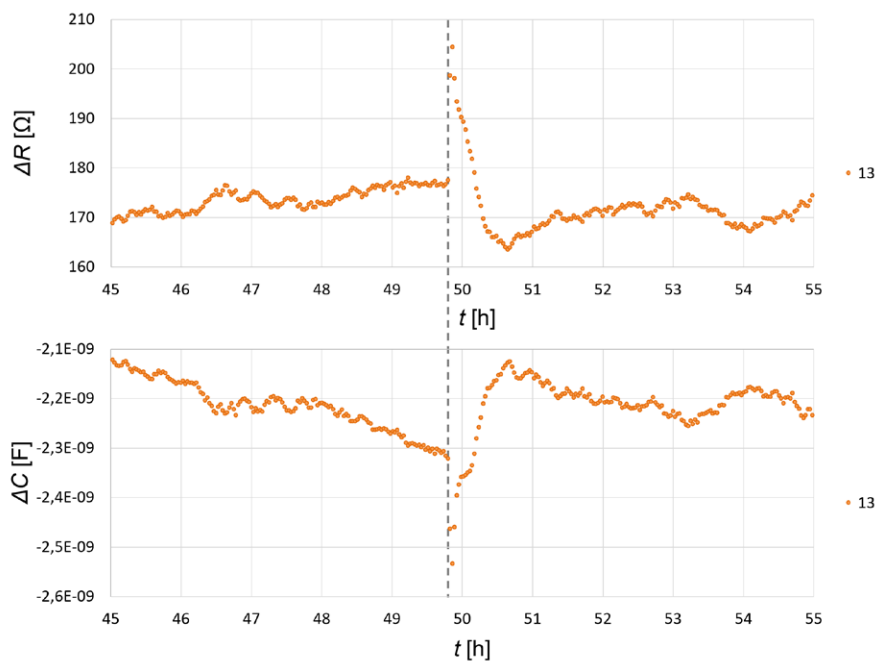
**Ryc. 4.50.** Dno naczynia po eksperymencie nr 12 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800×



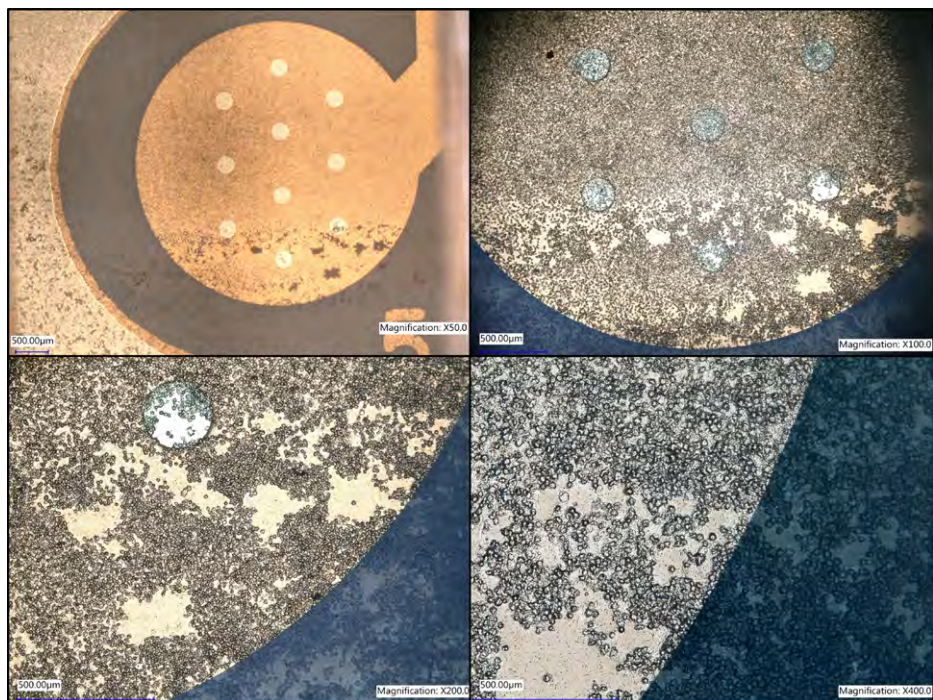
**Ryc. 4.51.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 12; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 49$  h 46 min (oznaczony linią przerywaną). Brak obserwowalnych zmian po aktywacji grzejnika wynika z uszkodzenia elementu grzejnego



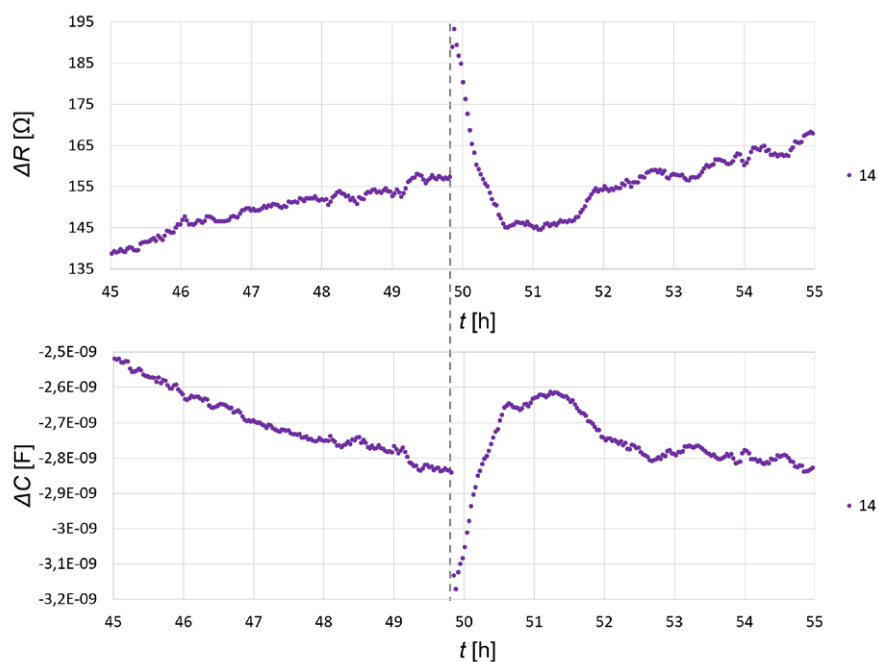
**Ryc. 4.52.** Dno naczynia po eksperymencie nr 13 w powiększeniach 50, 100, 200 i 300x



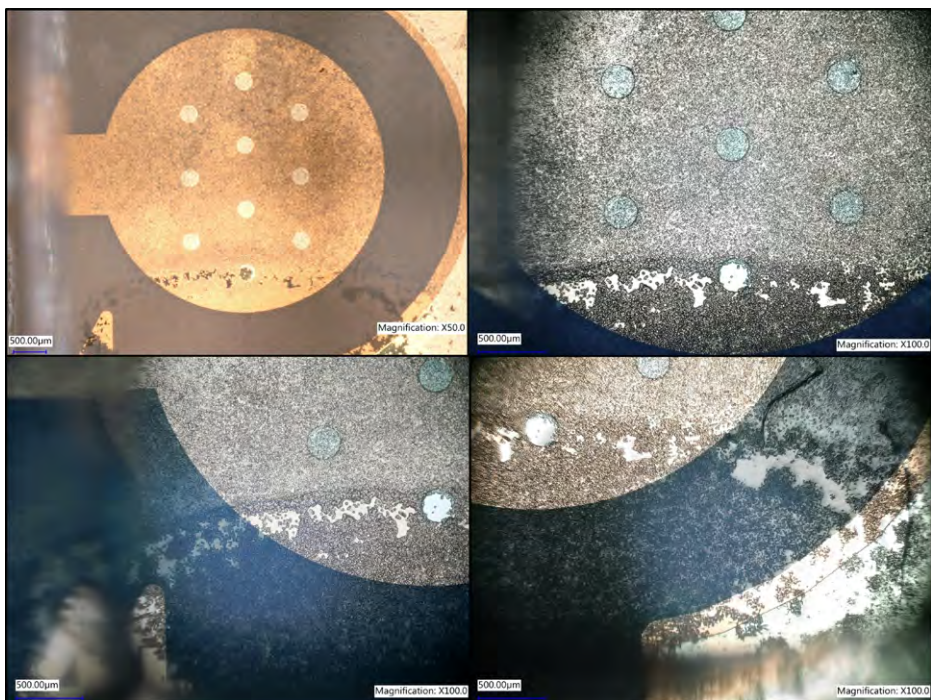
**Ryc. 4.53.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 13; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 49$  h 49 min (oznaczony linią przerywaną)



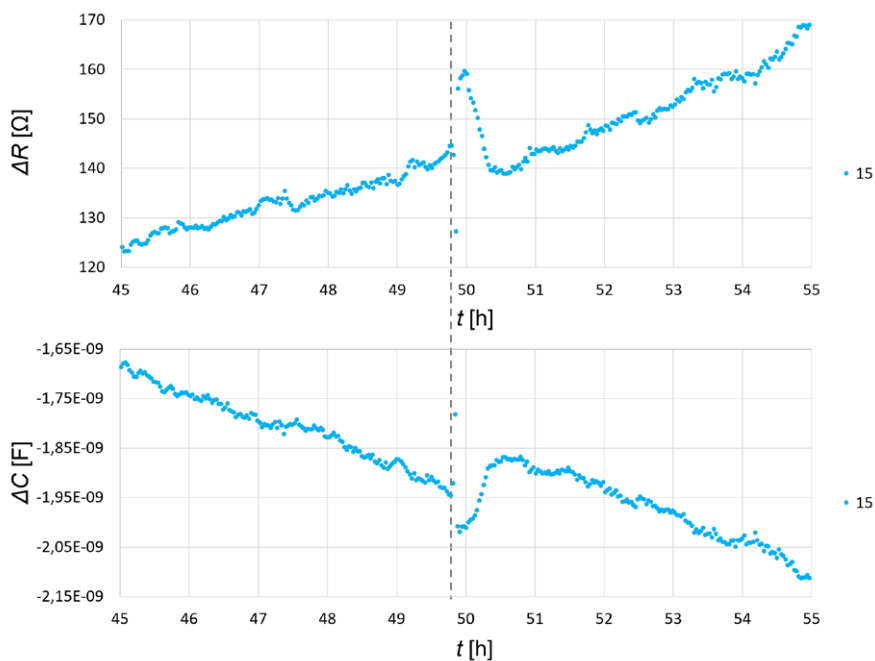
**Ryc. 4.54.** Dno naczynia po eksperymencie nr 14 w powiększeniach 50, 100, 200 i 400×



**Ryc. 4.55.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 14; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 49$  h 50 min (oznaczony linią przerywaną)



**Ryc. 4.56.** Dno naczynia po eksperymencie nr 15 w powiększeniach 50, 100, 100 i 100x



**Ryc. 4.57.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 15; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 49$  h 51 min (oznaczony linią przerywaną)

W kolejnej serii eksperymentów oddziaływanie termiczne aktywowano po ok. 24 godzinach od momentu dodania komórek do naczynia, czyli przed uformowaniem się jednorodnej monowarstwy komórek. Celem tego zabiegu była ocena potencjału regeneracyjnego komórek po termicznym uszkodzeniu w zaawansowanym etapie wzrostu. Energię z zakresu 7,97–16,65 J dostarczano w czasie 10 s. Szczegółowy plan eksperymentów nr 16–21 przedstawiono w tabeli 4.6.

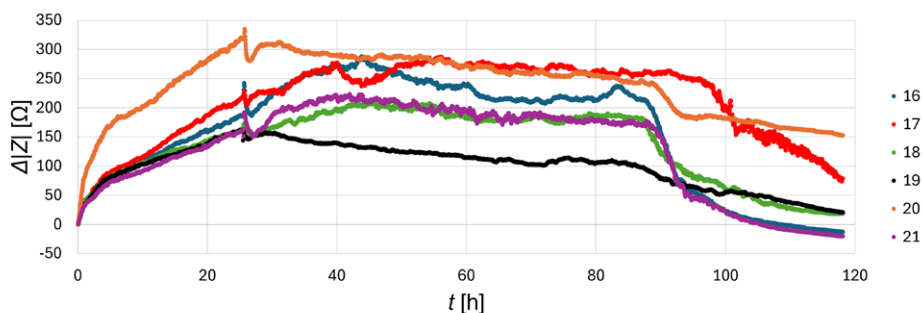
**Tabela 4.6.** Plan eksperymentu nr 3 – parametry dla 8 mikrogrzejników

| Lp. | Energia [J] | Moc [W] | Czas grzania [s] | Napięcie zasilające [V] | Nr mikrogrzejnika | Rezystancja mikrogrzejnika [ $\Omega$ ] | Czas od rozpoczęcia hodowli [h:min:s] |
|-----|-------------|---------|------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| 16  | 7,97        | 0,797   | 10               | 44                      | 1                 | 2420                                    | 25:34:45                              |
| 17  | 8,01        | 0,801   | 10               | 44,4                    | 3                 | 6100                                    | 25:35:33                              |
| 18  | 13,79       | 1,379   | 10               | 60                      | 6                 | 2430                                    | 25:36:25                              |
| 19  | 15,08       | 1,507   | 10               | 60,4                    | 8                 | 2410                                    | 25:33:10                              |
| 20  | 16,52       | 1,652   | 10               | 100,4                   | 4                 | 2610                                    | 25:38:47                              |
| 21  | 16,65       | 1,665   | 10               | 95,6                    | 5                 | 2460                                    | 25:37:59                              |

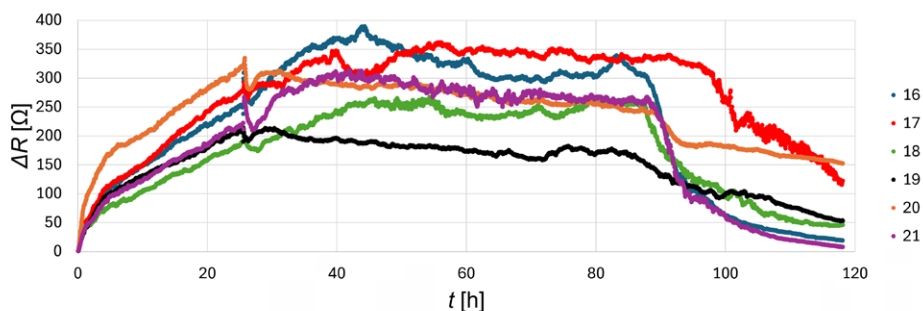
Hodowle komórkowe przeprowadzone w ramach eksperymentów nr 16–21 rozwijały się prawidłowo, prezentując pełny, charakterystyczny cykl życiowy obserwowany w warunkach *in vitro*. Na wykresach zmian mierzonych parametrów elektrycznych (ryc. 4.58–4.60) wyraźnie zaznaczają się kolejne etapy hodowli, obejmujące adhezję, formowanie się monowarstwy komórkowej, fazę stabilizacji oraz etap obumierania komórek. Po aktywacji mikrogrzejników, ok. 24. godziny od rozpoczęcia hodowli, zaobserwowano gwałtowne zmiany wartości impedancji, rezystancji i pojemności. Po upływie kilkunastu minut wartości tych parametrów uległy stabilizacji, a dalszy przebieg zmian odpowiadał charakterystycznym zmianom typowej hodowli komórkowej.

Wyniki eksperymentów 16–21 zestawiono w tabeli 4.7. Najbardziej istotne zmiany zaobserwowano w eksperymencie nr 17, gdzie aktywacja mikrogrzejnika wywołała wyraźną zmianę wartości parametrów elektrycznych, co sugeruje lokalną utratę adhezji komórek w obrębie inicjowanego uszkodzenia tworzącej się monowarstwy. Mimo to po zakończeniu hodowli obrazy mikroskopowe uwiadcniają w pełni ciągłą i zregenerowaną monowarstwę.

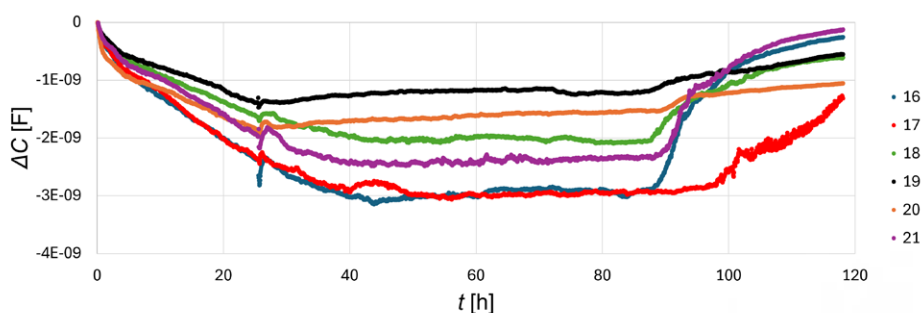
Proces regeneracji jest również widoczny na wykresach rezystancji i pojemności, gdzie po początkowym zakłóceniu wartości powracają w ciągu kilkunastu minut do poziomu sprzed aktywacji grzejnika, a następnie kontynuowany jest pierwotny trend zmian. W dalszym czasie wzrost rezystancji oraz równoległy spadek pojemności wskazują na kontynuację procesu formowania jednorodnej monowarstwy (ryc. 4.63–4.64).



**Ryc. 4.58.** Zmiana modułu impedancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 118 h (dla  $f = 16$  kHz) w eksperymentach 16–21, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 25$  h 32 min



**Ryc. 4.59.** Zmiana rezystancji w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 118 h (dla  $f = 4$  kHz) w eksperymentach 16–21, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 25$  h 32 min

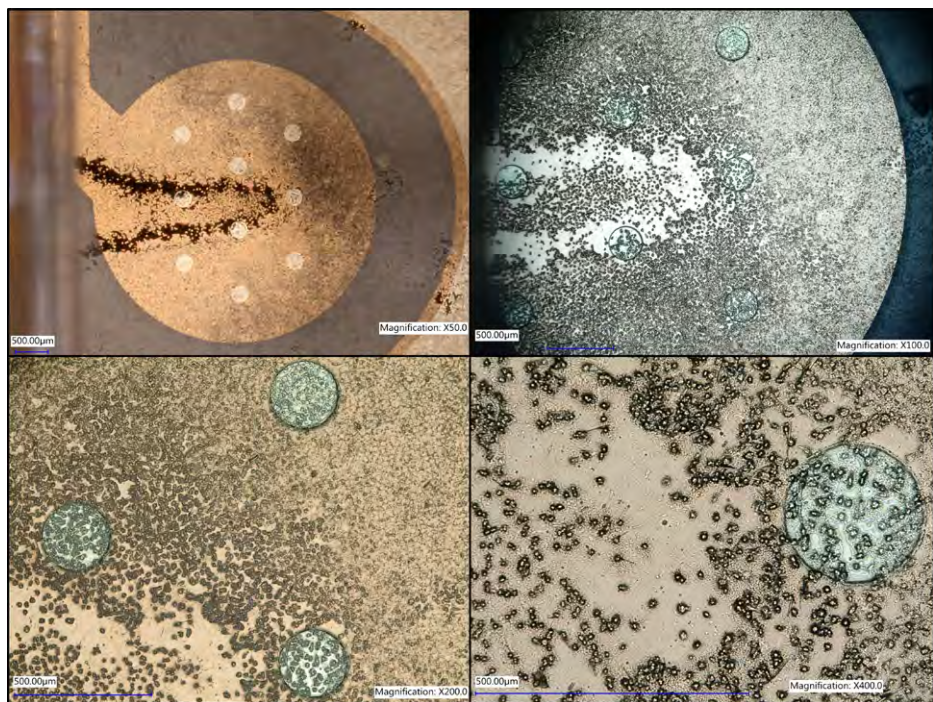


**Ryc. 4.60.** Zmiana pojemności w przypadku badania hodowli komórek trwającej ok. 118 h (dla  $f = 64$  kHz) w eksperymentach 16–21, aktywacja mikrogrzejnika od  $t = 25$  h 32 min

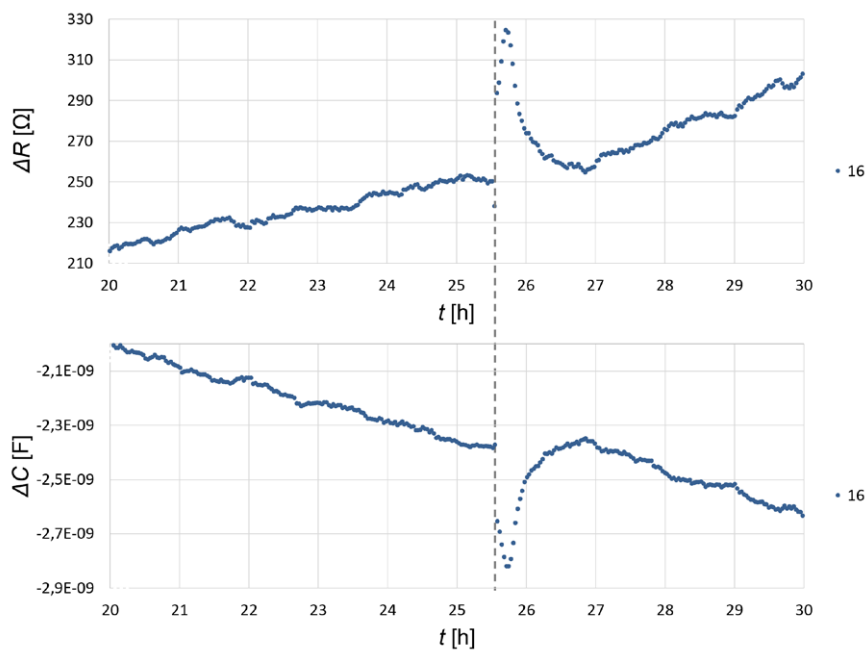
W pozostałych eksperymentach odnotowano wyraźne zmiany wartości  $R$ ,  $C$  oraz  $Z$ . Obrazy mikroskopowe wykonane po zakończeniu hodowli potwierdzają brak regeneracji monowarstwy w miejscu uszkodzenia. Do potencjalnych przyczyn niepowodzenia procesu regeneracji można zaliczyć: ograniczoną zdolność migracyjną komórek wynikającą z uformowania gęstej warstwy, ich niezdolność do skolonizowania uszkodzonego obszaru, a także degradację podłoża pod wpływem wysokiej temperatury, co mogło pogorszyć właściwości adhezyjne powierzchni i uniemożliwić zasiedlenie uszkodzonych obszarów (ryc. 4.61–4.62 oraz 4.65–4.72).

**Tabela 4.7.** Wyniki eksperymentów nr 16–21

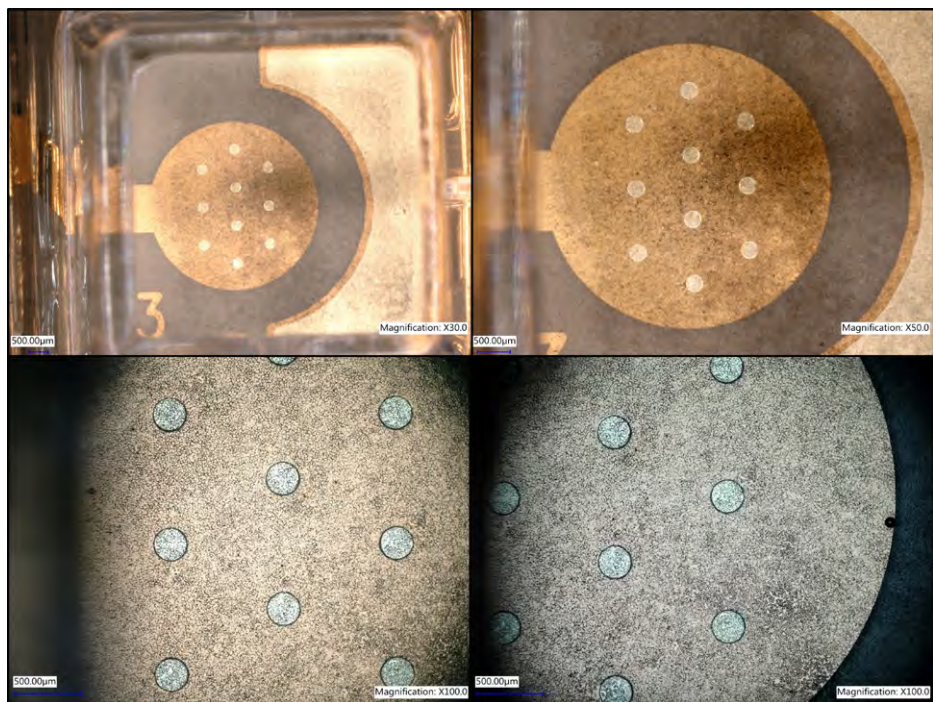
| Lp. | Nr mikro-grzejnika | Odpowiedź elektryczna na aktywację mikrogrzejnika                                                                                                                      | Stan monowarstwy po zakończeniu hodowli                                         |
|-----|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 16  | 1                  | Gwałtowna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; powrót do poziomu zbliżonego do tego sprzed aktywacji i kontynuacja pierwotnego trendu zmian (ryc. 4.61)                            | W uszkodzonym obszarze pozostały obumarłe komórki, brak regeneracji (ryc. 4.62) |
| 17  | 3                  | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; powrót do poziomu sprzed aktywacji i kontynuacja pierwotnego trendu zmian (ryc. 4.63)                                                 | Ciągła, jednorodna (ryc. 4.64)                                                  |
| 18  | 6                  | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.65)             | W uszkodzonym obszarze pozostały obumarłe komórki, brak regeneracji (ryc. 4.66) |
| 19  | 8                  | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.67)             | W uszkodzonym obszarze pozostały obumarłe komórki, brak regeneracji (ryc. 4.68) |
| 20  | 4                  | Wyraźna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; wolne stabilizowanie się parametrów na innym poziomie niż przed aktywacją grzejnika; przejście do odmiennego trendu zmian (ryc. 4.69) | Trwałe uszkodzenie monowarstwy; brak regeneracji (ryc. 4.70)                    |
| 21  | 5                  | Gwałtowna zmiana $R$ , $C$ i $Z$ ; stabilizacja parametrów na innym poziomie niż przed aktywacją grzejnika przy zachowaniu wcześniejszego trendu (ryc. 4.71)           | W uszkodzonym obszarze pozostały obumarłe komórki, brak regeneracji (ryc. 4.72) |



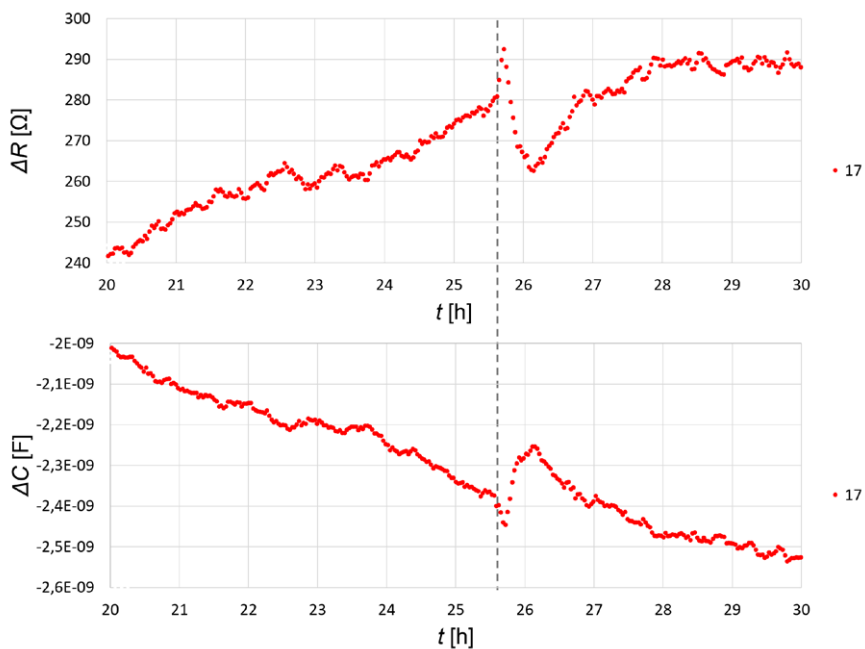
**Ryc. 4.61.** Dno naczynia po eksperymencie nr 16 w powiększeniach 50, 100, 200 i 400×



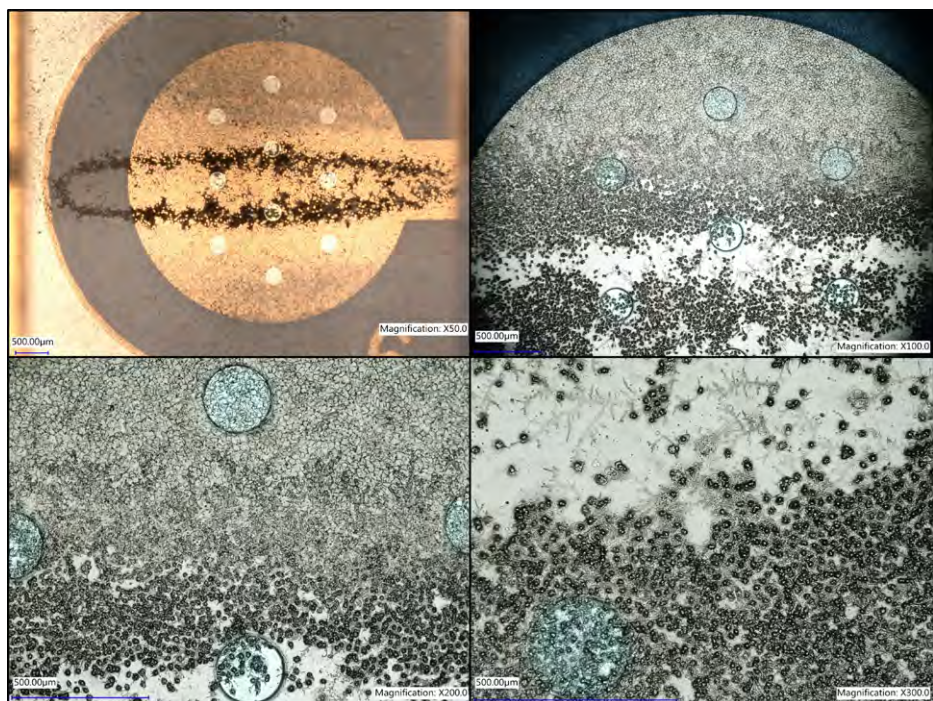
**Ryc. 4.62.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 16; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 25$  h 34 min (oznaczony linią przerywaną)



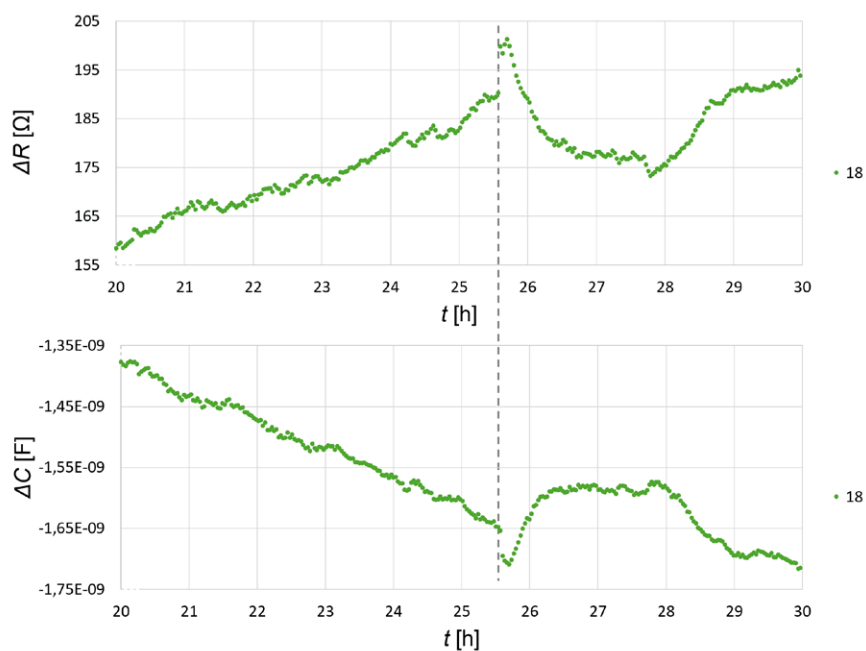
**Ryc. 4.63.** Dno naczynia po eksperymencie nr 17 w powiększeniach 30, 50, 100 i 100x



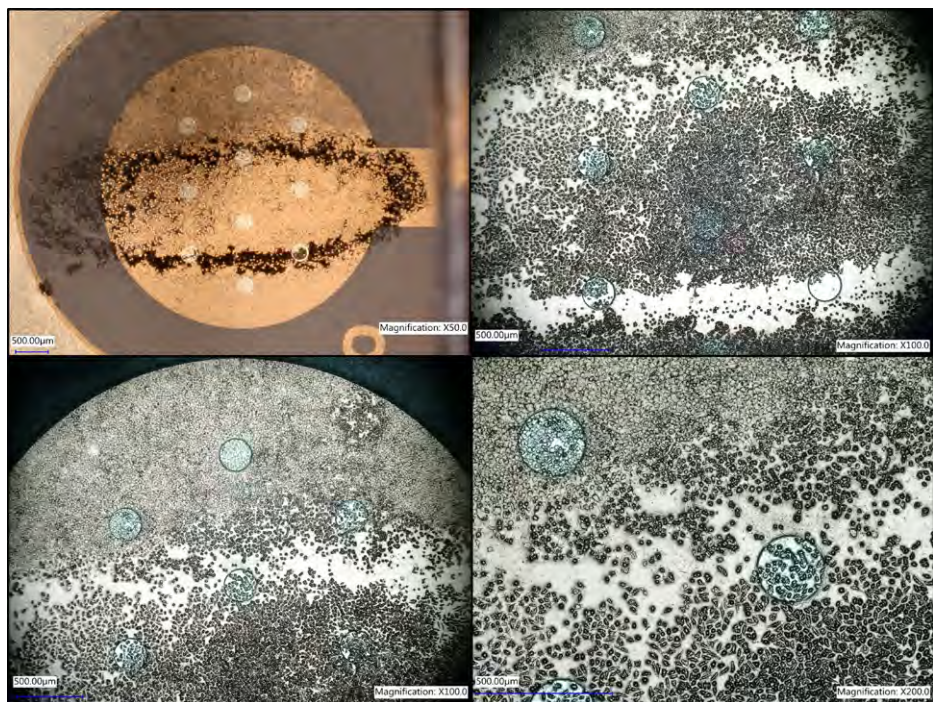
**Ryc. 4.64.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 17; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 25$  h 35 min (oznaczony linią przerywaną)



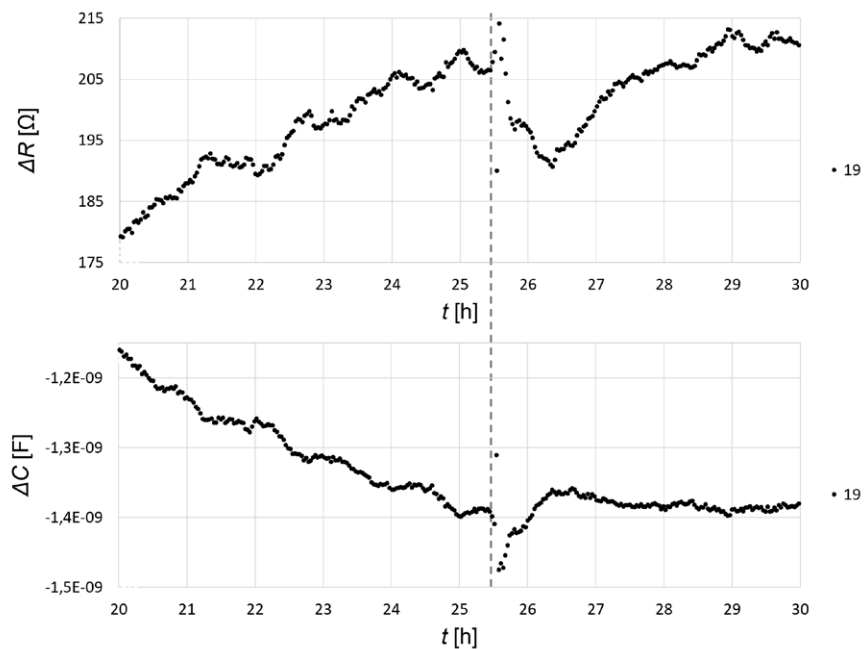
**Ryc. 4.65.** Dno naczynia po eksperymencie nr 18 w powiększeniach 50, 100, 200 i 300×



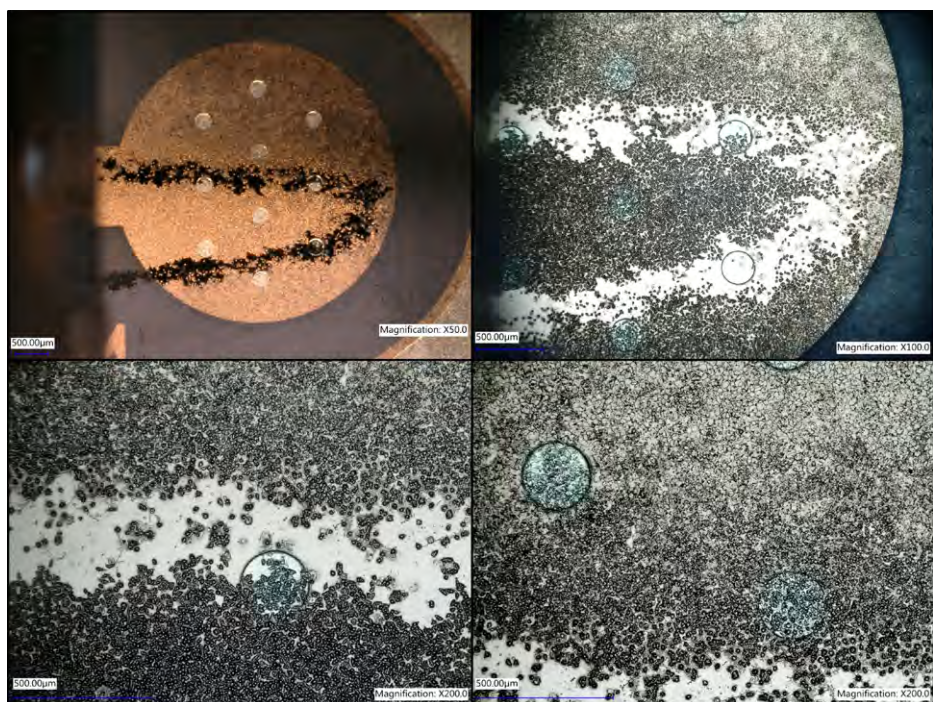
**Ryc. 4.66.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 18; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 25$  h 36 min (oznaczony linią przerywaną)



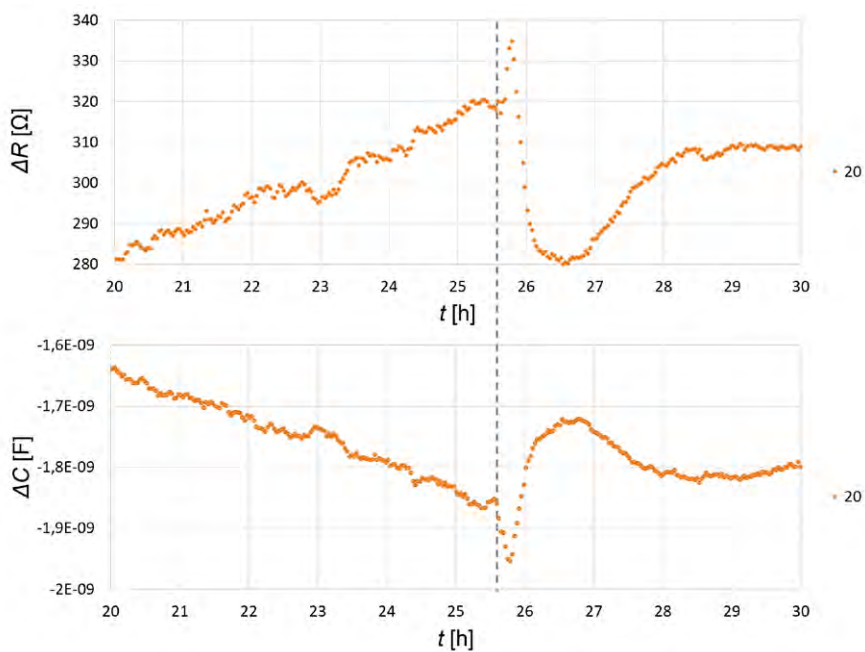
**Ryc. 4.67.** Dno naczynia po eksperymencie nr 19 w powiększeniach 50, 100, 100 i 200×



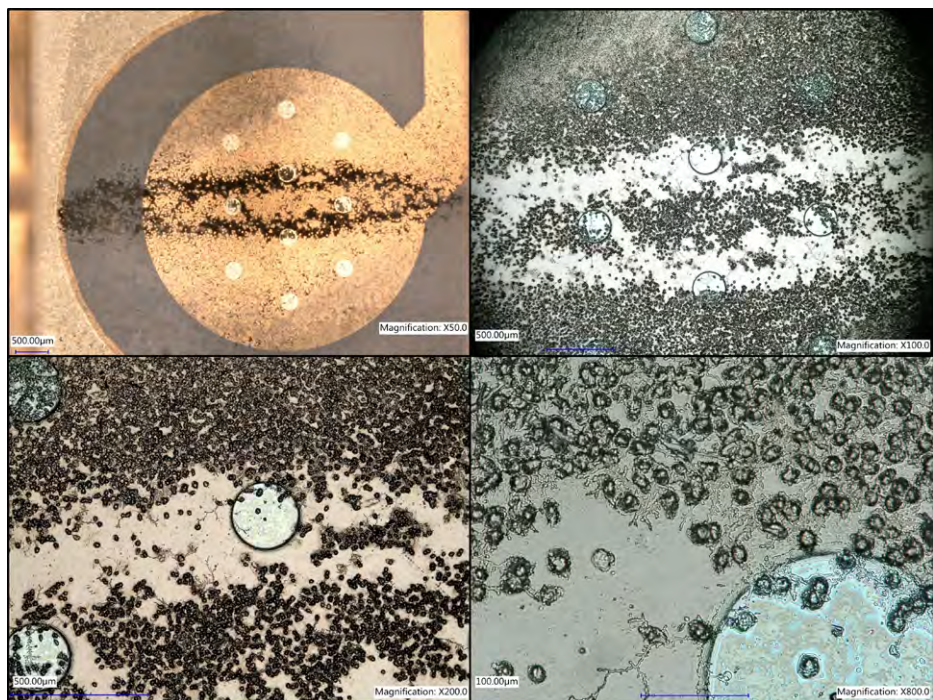
**Ryc. 4.68.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 19; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 25$  h 33 min (oznaczony linią przerywaną)



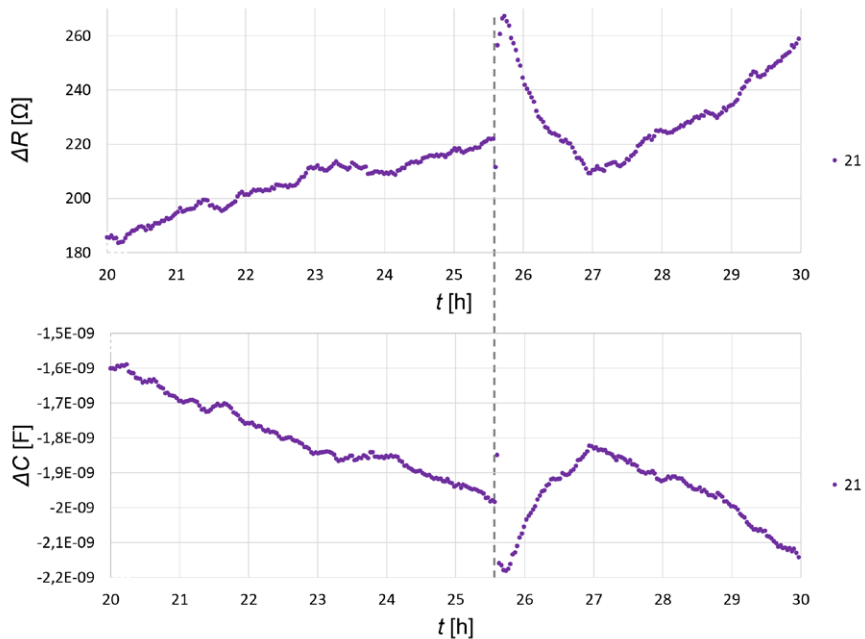
**Ryc. 4.69.** Dno naczynia po eksperymencie nr 20 w powiększeniach 50, 100, 200 i 200×



**Ryc. 4.70.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 20; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 25$  h 38 min (oznaczony linią przerywaną)



**Ryc. 4.71.** Dno naczynia po eksperymencie nr 21 w powiększeniach 50, 100, 200 i 800×



**Ryc. 4.72.** Zmiana rezystancji (dla  $f = 4$  kHz) oraz pojemności (dla  $f = 64$  kHz) podczas hodowli komórek w eksperymencie nr 21; czas na osi zawężono do zakresu  $\pm 5$  h od momentu aktywacji grzejnika  $t = 25$  h 37 min (oznaczony linią przerywaną)

W ramach badań nad termicznym uszkodzeniem monowarstwy komórkowej przeprowadzono łącznie 21 hodowli fibroblastów mysich, w których monitorowano zmiany impedancji, rezystancji oraz pojemności w funkcji czasu. We wszystkich eksperymentach komórki przechodziły typowy cykl życia *in vitro*, obejmujący fazę adhezji, namnażania, stabilizacji oraz obumierania, co potwierdza poprawność warunków hodowli.

Analiza odpowiedzi elektrycznej układu na aktywację mikrogrzejników wykazała, że lokalne podniesienie temperatury prowadzi do wyraźnych, dynamicznych zmian wartości mierzonych parametrów elektrycznych. Zmiany te były interpretowane jako efekt utraty adhezji komórek do podłoża, ich częściowego odrywania się oraz, w przypadku wyższych energii, obumierania. Charakter obserwowanych odpowiedzi był silnie zależny od energii dostarczonej do układu oraz od momentu aktywacji mikrogrzejnika względem etapu rozwoju hodowli.

W pierwszych seriach eksperymentów, w których mikrogrzejniki aktywowano po uformowaniu się jednorodnej monowarstwy komórkowej, zaobserwowano trzy zasadnicze typy odpowiedzi biologicznej. W przypadku niskich energii oddziaływania termicznego rejestrowano wyraźne, lecz przejściowe zmiany rezystancji, pojemności i impedancji, po których następował powrót wartości do poziomu sprzed aktywacji mikrogrzejnika oraz kontynuacja pierwotnego trendu zmian. Obrazy mikroskopowe wykonane po zakończeniu hodowli potwierdzały pełną regenerację monowarstwy w obszarze poddanym oddziaływaniu termicznemu. Taki przebieg eksperymentów można interpretować jako model przejściowego uszkodzenia termicznego, po którym następuje skuteczny proces gojenia.

Dla wyższych energii oddziaływania termicznego obserwowano gwałtowne zmiany parametrów elektrycznych, po których następował wolny powrót do odmiennych poziomów wartości, przy zachowaniu wcześniejszego trendu zmian lub jego modyfikacji. W tych przypadkach analiza obrazów mikroskopowych ujawniała trwałe uszkodzenie monowarstwy w miejscach oddziaływania termicznego, obecność obumarłych komórek w tym obszarze oraz znikomą regenerację. Martwe komórki tworzyły barierę mechaniczną, ograniczającą migrację żywych komórek i uniemożliwiającą odbudowę ciągłej warstwy.

W kolejnej serii eksperymentów oddziaływanie termiczne aktywowano na wcześniejszym etapie hodowli, przed pełnym uformowaniem się monowarstwy.

Celem było określenie potencjału regeneracyjnego komórek w zaawansowanym, lecz niezakończonym etapie wzrostu. Wyniki tych badań wskazują, że zdolność regeneracji jest silnie zależna nie tylko od energii dostarczonej do układu, lecz również od stopnia organizacji monowarstwy w momencie wystąpienia uszkodzenia. W jednym z eksperymentów zaobserwowano pełną regenerację pomimo wyraźnej, przejściowej zmiany parametrów elektrycznych, co potwierdza wysoką wrażliwość techniki ECIS na lokalne zmiany adhezji oraz jej przydatność do monitorowania procesów gojenia w czasie rzeczywistym.

W pozostałych przypadkach wczesne oddziaływanie termiczne prowadziło do trwałych uszkodzeń w obszarze mikrogrzejnika, co może być związane z ograniczoną zdolnością migracyjną komórek, degradacją właściwości adhezyjnych podłoża lub niekorzystnym wpływem wysokiej temperatury na strukturę powierzchni hodowlanej.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie mikrogrzejników w połączeniu z techniką ECIS stanowi skuteczne narzędzie do indukowania i monitorowania lokalnych uszkodzeń termicznych w monowarstwie komórkowej. Opracowana metoda umożliwia precyzyjne sterowanie stopniem jej uszkodzenia oraz ocenę odpowiedzi biologicznej komórek, w tym ich zdolności do regeneracji. Uzyskane wyniki wskazują na istnienie wyraźnych progów energetycznych oddzielających uszkodzenia odwracalne od nieodwracalnych, co ma istotne znaczenie zarówno dla badań podstawowych nad mechanizmami gojenia ran, jak i dla potencjalnych zastosowań w modelowaniu urazów termicznych *in vitro*.

#### 4.4. Dyskusja wyników

W niniejszym rozdziale przedstawiono i omówiono wyniki badań mających na celu ocenę możliwości wykorzystania mikrogrzejników w systemie impedancyjnego monitorowania hodowli komórkowych. Głównym założeniem prowadzonych prac było opracowanie nowego sposobu umożliwiającego prowadzenie eksperymentów *in vitro* w kontrolowanych, zróżnicowanych warunkach temperaturowych oraz ocena wpływu lokalnego wzrostu temperatury na przebieg hodowli komórkowej. W badaniach przewidziano dwa zastosowania

mikrogrzejnika: lokalne ogrzewanie wybranego naczynia w matrycy naczyń hodowlanych (rozdz. 4.2) oraz indukowanie miejscowych uszkodzeń termicznych w celu symulacji ran oparzeniowych (rozdz. 4.3).

Celem pierwszej części prac badawczych była ocena możliwości prowadzenia równoległych hodowli komórek *in vitro* w zróżnicowanych lokalnie warunkach temperaturowych. Do realizacji tego celu wytworzono cienkowarstwowy mikrogrzejnik z chromonikieliny. Został on umieszczony bezpośrednio pod naczyniem hodowlanym, zapewniając minimalny dystans pomiędzy źródłem ciepła a obszarem formowania się monowarstwy komórek. Następnie przeprowadzono pomiary charakterystyki termicznej opracowanego układu. Wykazano, że dostarczana moc grzewcza umożliwia skuteczne i lokalne podniesienie temperatury w obszarze namnażania komórek. W kolejnym etapie opracowano model konstrukcyjny układu mikrogrzejnik – podłoże pomiarowe oraz przeprowadzono symulacje termiczno-elektryczne. Uzyskane wyniki eksperymentalne pozostają w zgodności z rezultatami symulacji numerycznych, co potwierdza poprawność przyjętych założeń projektowych. Oznacza to, że zaproponowana metoda lokalnego podgrzewania może być skutecznie i bezpiecznie stosowana w eksperymentach z równoległym prowadzeniem hodowli komórkowych w kontrolowanych warunkach. Umożliwia to jej wykorzystanie do symulacji stanów patologicznych, analizy odpowiedzi komórek na zmiany temperatury oraz testowania środków farmakologicznych wpływających na metabolizm lub przeżywalność komórek w warunkach podwyższonej temperatury.

Druga część badawcza dotyczyła wykorzystania mikrogrzejnika do indukowania lokalnych uszkodzeń termicznych w celu symulacji ran oparzeniowych i analizy mechanizmów regeneracji monowarstwy komórek. Zaplanowano lokalne podgrzanie fragmentu hodowli do temperatury wywołującej uszkodzenia komórek, a następnie obserwację procesu gojenia w czasie rzeczywistym za pomocą systemu pomiarowego ECIS. W trakcie przeprowadzonych prac badawczych obserwowano wyraźną zmianę wartości rejestrowanych parametrów elektrycznych w momencie aktywacji elementu grzejnego, co interpretowano jako efekt utraty adhezji komórek do podłoża i powstania obszaru pozbawionego żywych komórek.

W zależności od dostarczonej energii cieplnej oraz etapu rozwoju hodowli obserwowano różną odpowiedź biologiczną. Przy niższych temperaturach

oddziaływania termicznego zmiany parametrów elektrycznych miały charakter przejściowy, a obrazy mikroskopowe potwierdzały zdolność komórek do regeneracji i odbudowy ciągłej monowarstwy. Z kolei przy wyższych temperaturach następowało trwałe uszkodzenie monowarstwy w obszarach oddziaływania mikrogrzejników, a martwe komórki tworzyły barierę mechaniczną uniemożliwiającą migrację i regenerację. Zjawisko to ogranicza możliwość bezpośredniego porównania uzyskanych wyników z powszechnie stosowanymi modelami gojenia ran, jednak jednocześnie wiernie odzwierciedla charakter uszkodzeń termicznych występujących w przypadku oparzeń.

Uzyskane rezultaty wskazują, że zaproponowana metoda umożliwia nie tylko ocenę stopnia uszkodzenia monowarstwy, lecz także identyfikację progów energetycznych oddzielających uszkodzenia odwracalne od nieodwracalnych. Stanowi to istotną wartość poznawczą w badaniach nad mechanizmami odpowiedzi komórek na stres termiczny oraz w modelowaniu urazów termicznych *in vitro*.

Podsumowując, integracja mikrogrzejnika z przetwornikiem impedancyjnym ECIS stworzyła funkcjonalny układ badawczy umożliwiający lokalną i dynamiczną kontrolę temperatury przy jednoczesnym monitorowaniu odpowiedzi biologicznej komórek. Zaproponowane rozwiązanie może znaleźć zastosowanie zarówno w badaniach podstawowych nad fizjologią komórek, jak i w aplikacjach biomedycznych, takich jak testowanie terapii, modelowanie urazów czy analiza procesów regeneracyjnych w warunkach kontrolowanego stresu termicznego.



## 5. Podsumowanie i wnioski

Pierwszy etap badań obejmował ocenę przydatności wybranych metali do budowy pojemnościowych elektrod pomiarowych w układzie komórka-podłoże dostosowanych do współpracy z systemem pomiarowym ECIS Z-Theta. Głównym celem była ocena możliwości zastosowania powszechnie stosowanych materiałów cienkowarstwowych (Cu, Ni, Ti, NiCr) do wytworzenia elektrod pomiarowych i mikrogrzejników w jednym układzie. W oparciu o eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem mysich fibroblastów L929 oraz małpich komórek VERO wykazano, że:

- elektrody miedziane przetworników impedancyjnych, tak jak się spodziewano, ulegają szybkiemu procesowi degradacji chemicznej i wykazują cytotoksyczność, co potwierdziło ich znikomą przydatność do długoterminowych pomiarów biologicznych,
- elektrody niklowe, przy odpowiednim przygotowaniu powierzchni, umożliwiały adhezję i proliferację komórek, jednak wykazywały dużą zmienność mierzonych parametrów elektrycznych między powtórzeniami ograniczając ich użyteczność w powtarzalnych badaniach,
- elektrody tytanowe, mimo oczekiwanych dobrych właściwości biokompatybilnych, okazały się niestabilne w warunkach eksperymentu i ulegały degradacji w obecności pożywki oraz pola elektrycznego. Mimo

prawidłowego zachowania komórek, niestabilność elektrod istotnie obniżała wiarygodność i powtarzalność rejestrowanych wyników oraz utrudniała jednoznaczną interpretację dynamiki rozwoju hodowli,

- elektrody z chromonikieliny wykazały największą stabilność oraz powtarzalność hodowli komórkowych, umożliwiając schematyczne monitorowanie zmian impedancji związanych z jej rozwojem.

Wszystkie hodowle komórkowe prowadzono zgodnie z obowiązującymi normami i standardami biomedycznymi. W ramach badań monitorowano w funkcji czasu charakterystyki impedancji, rezystancji oraz pojemności hodowli komórkowych. Uzyskane dane elektryczne skorelowano następnie z obrazowaniem mikroskopowym, co pozwoliło na weryfikację zgodności między charakterystyką impedancyjną a rzeczywistym obrazem morfologii komórek. Zaobserwowano, że w hodowlach rozwijających się prawidłowo zmiany parametrów elektrycznych w funkcji czasu odzwierciedlają oczekiwany wzorec, potwierdzony wizualnie. Badania metodą ECIS wykazały, że chromonikielina stanowi alternatywę dla konwencjonalnych elektrod ze złota lub platyny. Jej zastosowanie pozwala na uniknięcie stosunkowo złożonych i kosztownych procesów osadzania złota lub platyny na podłożach polimerowych.

W kolejnym etapie badań zaprezentowano koncepcję i przeprowadzono cykl badań nad sposobu lokalnego podgrzewania hodowli komórkowych z przetwornikiem impedancyjnym z wykorzystaniem cienkowarstwowych mikrogrzejników rezystancyjnych wykonanych z chromonikieliny. Przeprowadzono szereg doświadczeń technologicznych i eksperymentów hodowlanych z wykorzystaniem cienkowarstwowego mikrogrzejnika z NiCr na podłożu ceramicznym oraz matrycowych rezystorów grzewczych na podłożu PCB wykonanych metodą nanoszenia cienkiej warstwy i fotolitografii.

Pierwszy rodzaj przeznaczony jest do punktowego podgrzewania pojedynczego naczynia hodowlanego, minimalizując przenikanie ciepła do naczyń sąsiednich. Dzięki tej konfiguracji, na jednej platformie pomiarowej możliwe jest równoległe prowadzenie serii hodowli komórkowych w odrębnych reżimach temperaturowych. Pozwala to na bezpośrednie porównanie i niezależną analizę wpływu różnic temperatury na żywotność, morfologię i funkcje

komórek w ramach tego samego eksperymentu, eliminując zmienność między poszczególnymi próbkami.

Drugi sposób służy do matrycowego podgrzewania wszystkich hodowli komórkowych w trybie długotrwałym lub impulsowym. Umożliwia on indukcję lokalnych uszkodzeń termicznych w celu symulacji ran oparzeniowych i analizę zdolności regeneracyjnych monowarstwy komórkowej.

W obu przypadkach wykazano że zastosowane mikrogrzejniki cienkowarstwowe zapewniają precyzyjną modulację temperatury bez zakłócania pomiarów impedancyjnych. Opracowano w ten sposób hybrydową platformę, łączącą pomiar stanu hodowli (ECIS) z możliwością stymulacji określonych warunków temperaturowych stacjonarnych i dynamicznych. Przedstawione rozwiązanie łączące monitorowanie hodowli komórkowej przy wykorzystaniu przetwornika impedancyjnego i mikrogrzejnika stanowi podstawę do opracowania zaawansowanego instrumentu. Umożliwi on prowadzenie badań nad kontrolowanym uszkodzaniem termicznym monowarstw komórkowych w celu modelowania gojenia ran oparzeniowych. Pozwoli na analizę procesów regeneracji w różnych warunkach, w tym podczas aplikacji potencjalnych czynników terapeutycznych, co otwiera drogę do testowania eksperymentalnych terapii.

Do kluczowych osiągnięć zaprezentowanych w niniejszej pracy, zdaniem autora, zaliczyć należy:

- Rozszerzenie zakresu stosowania systemu pomiarowego ECIS poprzez:
  - Ocenę oddziaływania różnych materiałów metalicznych pozostających w bezpośrednim kontakcie z komórkami na ich aktywność biologiczną,
  - wykazanie przydatności cienkich warstw chromonikieliny , jako tańszej i technologicznie korzystniejszej alternatywy dla stosowanych wcześniej złota lub platyny,
  - opracowanie układu łączącego pomiar impedancyjny z lokalną kontrolą temperatury w hodowlach komórkowych,
  - zbadanie wielu hodowli z określeniem ich parametrów, co umożliwia skalowanie eksperymentów, łącznie ze stosowaniem statycznych i dynamicznych zmian temperatury,

- lokalną modulację warunków temperaturowych pojedynczych naczyń hodowlanych wraz z możliwością analizy odpowiedzi biologicznej komórek pod wpływem tej zmiany,
- zastosowanie dynamicznej zmiany temperatury przy użyciu mikrogrzejników wraz z równoległą analizą odpowiedzi biologicznej komórek w celu symulacji uszkodzeń termicznych i monitorowania procesów regeneracyjnych, m.in. w modelu gojenia ran oparzeniowych.
- Opracowanie konstrukcji i technologii cienkowarstwowych elektrod pojemnościowych wykonanych z różnych metali (Cu, Ti, Ni, NiCr) na podłożu poliwęglanowym przy zastosowaniu procesów niskotemperaturowych.
- Projekt i realizację cienkowarstwowych mikrogrzejników, w tym modelowanie i analizę ich właściwości termicznych w kontekście lokalnego ogrzewania w układach do hodowli komórkowych.
- Funkcjonalną weryfikację zaproponowanych układów pomiarowych oraz ocenę ich przydatności w monitorowaniu odpowiedzi biologicznej komórek hodowanych w warunkach kontrolowanej temperatury przeprowadzoną poprzez serię eksperymentów z wykorzystaniem linii komórkowych pochodzenia zwierzęcego (L929 oraz VERO).

Podsumowując, badania przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że materiały powszechnie uznawane za biokompatybilne, takie jak tytan i nikiel, nie spełniają zakładanych wymagań w zakresie długoterminowej stabilności pomiarowej w metodzie impedancyjnej. Natomiast chromonikielina okazała się materiałem optymalnym, umożliwiającym wytworzenie stabilnych elektrod, na których hodowle komórkowe zachowują swój potencjał biologiczny, rozwijają się prawidłowo, a ich stan jest wiarygodnie odzwierciedlany w wynikach pomiarów elektrycznych.

Kolejny etap badań koncentrował się na połączeniu przetwornika impedancyjnego z mikrogrzejnikiem umożliwiającym zadawanie kontrolowanej temperatury hodowli komórkowej, zarówno w trybie stacjonarnym, jak i dynamicznym. Wykazano, że mikrogrzejniki wykonane z chromonikieliny na podłożu ceramicznym oraz płytce PCB, nie zakłócają pomiarów impedancji. Tym samym potwierdzono możliwość prowadzenia badań nad lokalną modulacją warunków temperaturowych oraz właściwościami regeneracyjnymi komórek zwierzęcych i ludzkich po uszkodzeniach termicznych.

Kontynuacją przedstawionych badań jest opracowanie w pełni zintegrowanej platformy, w której zarówno przetwornik impedancyjny, jak i mikrogrzejnik zostaną wytworzone z jednej warstwy chromonikieliny. Takie rozwiązanie stworzy dwufunkcyjny model *in vitro* do badań nad gojeniem ran oparzeniowych i odpowiedzią komórek na stres cieplny.

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy autora opracowany dwufunkcyjny układ stanowi jedno z pierwszych tego typu rozwiązań, umożliwiających jednocześnie monitorowanie odpowiedzi biologicznej komórek oraz kontrolę warunków termicznych hodowli. Opracowany układ może znaleźć zastosowanie w rozwoju narzędzi do badań i terapii spersonalizowanych, obejmujących zarówno stany podwyższonej temperatury, jak i – po rozszerzeniu układu o elementy termoelektryczne, takie jak chłodziarka Peltiera – również warunki hipotermii.

Na podstawie wyników niniejszej pracy, potwierdzających przydatność analizy impedancyjnej w badaniach nad odpowiedzią komórek na czynniki zewnętrzne, autor przeprowadził studium, gdzie celem była wstępna ocena możliwości wykorzystania pomiarów impedancyjnych do detekcji odpowiedzi komórkowej na ekspozycję elektromagnetyczną oraz identyfikacja potencjalnych kierunków dalszych badań w tym obszarze [224].



## Bibliografia

- [1] Mwema F.M., Jen T.-C., Zhu L., *Thin Film Coatings: Properties, Deposition, and Applications*, CRC Press, Boca Raton 2022. <https://doi.org/10.1201/9781003202615>.
- [2] Greene J.E., *Review Article: Tracing the recorded history of thin-film sputter deposition: From the 1800s to 2017*, „Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films” 2017, vol. 35, 05C204. <https://doi.org/10.1116/1.4998940>.
- [3] Wasa K., Kanno I., Kotera H., *Handbook of Sputter Deposition Technology*, Second Edition, Elsevier, Waltham 2012. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67037-4>.
- [4] Seshan K., *Handbook of Thin Film Deposition: Techniques, Processes, and Technologies*, Elsevier, New York 2012. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64359-2>.
- [5] Simon A.H., *Handbook of Thin Film Deposition*, Elsevier, New Jersey 2012.
- [6] Garg R. et al., *Sputtering thin films: Materials, applications, challenges and future directions*, „Advances in Colloid and Interface Science” 2024, vol. 330, s. 103203. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2024.103203>.
- [7] Grossi M., Riccò B., *Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review*, „Journal of Sensors and Sensor Systems” 2017, vol. 6, s. 303–325. <https://doi.org/10.5194/JSSS-6-303-2017>.
- [8] Fricke H., *A mathematical treatment of the electric conductivity and capacity of disperse systems ii. The capacity of a suspension of conducting spheroids surrounded by a non-conducting membrane for a current of low frequency*, „Physical Review” 1925, vol. 26, s. 678–681. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.26.678>.
- [9] Cole K.S., Curtis H.J., *Electric impedance of single marine eggs*, „Journal of General Physiology” 1938, vol. 21, s. 591–599. <https://doi.org/10.1085/jgp.21.5.591>.
- [10] Cole K.S., Guttman R.M., *Electric impedance of the frog egg*, „Journal of General Physiology” 1942, vol. 25, s. 765–775. <https://doi.org/10.1085/jgp.25.5.765>.
- [11] Łobacz A., Kowalik J., Ziajka S., *Wykorzystanie zjawiska impedancji w mikrobiologii i higienie żywności*, „Medycyna Weterynaryjna” 2008, vol. 64, s. 966–968.
- [12] Xu Y., Xie X., Duan Y., Wang L., Cheng Z., Cheng J., *A review of impedance measurements of whole cells*, „Biosensors and Bioelectronics” 2016, vol. 77, s. 824–836. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.10.027>.
- [13] Lin J.-M., ed. *Cell analysis on microfluidics*, Springer Singapore, Singapore 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5394-8>.
- [14] Callegaro L., *Electrical impedance: principles, measurement, and applications*, CRC Press, Boca Raton 2013.
- [15] Dusza J., Gortat G., Leśniewski A., *Podstawy miernictwa*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2002.
- [16] Giaever I., Keese C.R., *Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field*, „Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America” 1984, vol. 81, s. 3761–3764. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.12.3761>.

- [17] Moghtaderi H. *et al.*, *Electric cell-substrate impedance sensing in cancer research: An in-depth exploration of impedance sensing for profiling cancer cell behavior*, „Sensors and Actuators Reports” 2024, vol. 7, 100188. <https://doi.org/10.1016/J.SNR.2024.100188>.
- [18] Mansor A.F.M. *et al.*, *Gold-coated Impedance Biosensors on PCB and PET for Real-Time Monitoring of Cancer Cells*, „ECS Sensors Plus” 2024, vol. 3, 042401. <https://doi.org/10.1149/2754-2726/AD8CC7>.
- [19] Zhang Y., Wei M., Zhang F., Guo J., *High-accuracy gastric cancer cell viability evaluation based on multi-impedance spectrum characteristics*, „Heliyon” 2023, vol. 9, e14966. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E14966>.
- [20] Crowell L.L., Henriquez L.A., Tran M., Adams T.N.G., *Electrical Impedance Spectroscopy as a Tool to Detect the Epithelial to Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Cells*, „BioRxiv: The Pre-print Server for Biology” 2024, vol. 9, 615724. <https://doi.org/10.1101/2024.09.29.615724>.
- [21] Friedrich S., Malagimani N., Michaelis S., Wegener J., *Development of a label-free, impedance-based biosensor to identify harmful effects of pesticides on insect cells*, „Applied Research” 2024, vol. 3, e202400032. <https://doi.org/10.1002/APPL.202400032>.
- [22] Rose O.L., Arnold M., Dinu C.Z., *Electric Cell-Substrate Sensing for Real-Time Evaluation of Metal-Organic Framework Toxicological Profiles*, „Journal of Visualized Experiments” 2023, e65313. <https://doi.org/10.3791/65313>.
- [23] Giaever I., Keese C.R., *Use of Electric Fields to Monitor the Dynamical Aspect of Cell Behavior in Tissue Culture*, „IEEE Transactions on Biomedical Engineering” 1986, vol. 33, s. 242–247. <https://doi.org/10.1109/TBME.1986.325896>.
- [24] Giaever I., Keese C.R., *Micromotion of mammalian cells measured electrically*, „Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America” 1991, vol. 88, s. 7896–7900. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7896>.
- [25] Giaever I., Keese C.R., *A morphological biosensor for mammalian cells*, „Nature” 1993, vol. 366, s. 591–592. <https://doi.org/10.1038/366591a0>.
- [26] Giaever I., Keese C.R., *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing Concept to Commercialization*, „Electric Cell-Substrate Impedance Sensing and Cancer Metastasis”, vol. 17, Springer Netherlands, Dordrecht 2012, s. 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4927-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4927-6_1).
- [27] Schaller L., Hofmann K., Geiger F., Dietrich A., *Electrical cell-substrate impedance sensing (ECIS) in lung biology and disease*, „Applied Research” 2024, vol. 3, e202400059. <https://doi.org/10.1002/APPL.202400059>.
- [28] Gu A.Y., Kho D.T., Johnson R.H., Scott Graham E., O’Carroll S.J., *In Vitro Wounding Models Using the Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)-Z $\theta$  Technology*, „Biosensors” (Basel) 2018, vol. 8, 90. <https://doi.org/10.3390/BIOS8040090>.
- [29] Bagnaninchi P.O., Drummond N., *Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing*, „Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America” 2011, vol. 108, 6462–6267. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1018260108/SUPPL\\_FILE/PNAS.201018260SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1018260108/SUPPL_FILE/PNAS.201018260SI.PDF).

- [30] Charrier L, Yan Y, Driss A, Labois CL, Sitaraman S V., Merlin D., *ADAM-15 inhibits wound healing in human intestinal epithelial cell monolayers*, „The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology” 2005, vol. 288, s. 346–353. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00262.2004>.
- [31] Luong J.H.T. et al., *Extended applications of electric cell-substrate impedance sensing for assessment of the structure–function of  $\alpha 2\beta 1$  integrin*, „Analytica Chimica Acta” 2004, vol. 501, s. 61–69. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2003.09.016>.
- [32] Chiu W.C, Chen WL, Lai YT, Hung YH, Lo CM., *Cell–Electrode Models for Impedance Analysis of Epithelial and Endothelial Monolayers Cultured on Microelectrodes*, „Sensors” 2024, vol. 24, 4214. <https://doi.org/10.3390/S24134214>.
- [33] Chebotarev O., Ugodnikov A., Simmons C.A., *Porous Membrane Electrical Cell-Substrate Impedance Spectroscopy for Versatile Assessment of Biological Barriers In Vitro*, „American Chemical Society’s Applied Bio Materials” 2024, vol. 7, s. 2000–2011. <https://doi.org/10.1021/ACSABM.4C00114>.
- [34] Kim S., Nam S., Yeon S., Jang M., *Simultaneous analysis of cell death rate as a function of drug concentration using a semiconductor-fabricated multi-well array impedance biosensor*, „Microchemical Journal” 2025, vol. 212, s. 113186. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.113186>.
- [35] Zhang Z., Yuan X., Guo H., Shang P., *The Influence of Electrode Design on Detecting the Effects of Ferric Ammonium Citrate (FAC) on Pre-Osteoblast through Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)*, „Biosensors” (Basel) 2023, vol. 13, s. 322. <https://doi.org/10.3390/BIOS13030322>.
- [36] Price D.T., Rahman A.R.A, Bhansali S., *Design rule for optimization of microelectrodes used in electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)*, „Biosensors & Bioelectronics” 2009, vol. 24, s. 2071–2076. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.026>.
- [37] Wang L., Wang H., Wang L., Mitchelson K., Yu Z., Cheng J., *Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell–substrate impedance sensors*, „Biosensors & Bioelectronics” 2008, vol. 24, s. 14–21. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2008.03.018>.
- [38] Yoo T. et al., *The real-time monitoring of drug reaction in HeLa cancer cell using temperature/impedance integrated biosensors*, „Sensors & Actuators, B: Chemical” 2019, vol. 291, s. 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2019.03.145>.
- [39] Vizvari Z. et al., *Reproducibility analysis of bioimpedance-based self-developed live cell assays*, „Scientific Reports” 2024, vol. 14, 16380. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67061-2>.
- [40] Chmayssem A. et al., *New Microfluidic System for Electrochemical Impedance Spectroscopy Assessment of Cell Culture Performance: Design and Development of New Electrode Material*, „Biosensors” (Basel) 2022, vol. 12, 452. <https://doi.org/10.3390/BIOS12070452>.
- [41] Puetz P., Behrent A., Baeumner A.J., Wegener J., *Laser-scribed graphene (LSG) as new electrode material for impedance-based cellular assays*, „Sensors & Actuators, B: Chemical” 2020, vol. 321, 128443. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128443>.

- [42] Choi C.K., English A.E., Jun S.I., Kihm K.D., Rack P.D., *An endothelial cell compatible biosensor fabricated using optically thin indium tin oxide silicon nitride electrodes*, „Biosensors & Bioelectronics” 2007, vol. 22, s. 2585–2590. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2006.10.006>.
- [43] Pham D.T. et al., *Label-Free and Real-Time Electrical Impedance Monitoring of Macrophage Polarization of THP-1 Monocytes on Indium Tin Oxide Electrode*, „BioChip Journal” 2024, vol. 18, s. 103–114. <https://doi.org/10.1007/S13206-023-00132-0>.
- [44] Hsiao Y.S. et al., *PEDOT: PSS-Based Bioelectrodes for Multifunctional Drug Release and Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*, „ACS Applied Materials & Interfaces” 2023, vol. 15, s. 21953–21964. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.3C02769>.
- [45] Das L., Das S., Chatterjee J., *Electrical Bioimpedance Analysis: A New Method in Cervical Cancer Screening*, „Journal of Medical Engineering” 2015, vol. 2015, 636075. <https://doi.org/10.1155/2015/636075>.
- [46] Iwakura T., Marschner J.A., Zhao Z.B., Świdarska M.K., Anders H.-J., *Electric cell-substrate impedance sensing in kidney research*, „Nephrology Dialysis Transplantation” 2019, vol. 19, s. 2928–2929. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh486>.
- [47] Voiculescu I., Toda M., Inomata N., Ono T., Li F., *Nano and Microsensors for Mammalian Cell Studies*, „Micromachines” (Basel) 2018, vol. 9, s. 439. <https://doi.org/10.3390/MI9090439>.
- [48] Jiang W.G., ed., *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing and Cancer Metastasis*, vol. 17, Springer Netherlands, Dordrecht 2012. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4927-6>.
- [49] Wegener J., Keese C.R.R., Giaever I., *Electric Cell–Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces*, „Experimental Cell Research” 2000, vol. 259, s. 158–166. <https://doi.org/10.1006/EXCR.2000.4919>.
- [50] Kociubiński A., Zarzeczny D., Duk M., Bieniek T., *Analysis of Heat Flow for In Vitro Culture Monitored by Impedance Measurement*, „Energies” (Basel) 2022, vol. 15, 8231. <https://doi.org/10.3390/EN15218231>.
- [51] Anderson S.E., Bau H.H., *Electrical detection of cellular penetration during microinjection with carbon nanopipettes*, „Nanotechnology” 2014, vol. 25, 245102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/24/245102>.
- [52] Zhang X., Wang W., Jang S., *The Modeling, Design, Fabrication, and Application of Biosensor Based on Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) Technique in Environmental Monitoring*, „Biosensors for Environmental Monitoring”, IntechOpen; 2018. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81178>.
- [53] Gentet L.J., Stuart G.J., Clements J.D., *Direct Measurement of Specific Membrane Capacitance in Neurons*, „Biophysical Journal” 2000, vol. 79, s. 314–320. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76293-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76293-X).
- [54] Lo C.M.M., Keese C.R.R., Giaever I., *Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing*, „Biophysical Journal” 1995, vol. 69, s. 2800–2807. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80153-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80153-0).

- [55] Asphahani F., Zhang M., *Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection*, „Analyst” 2007, vol. 132, s. 835–841. <https://doi.org/10.1039/B704513A>.
- [56] Spira M.E., Hai A., *Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology*, „Nature Nanotechnology” 2013, vol. 8, s. 83–94. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.265>.
- [57] Li H. et al., *Detection of cardiovascular drugs and marine toxins using a multifunctional cell-based impedance biosensor system*, „Analytical Methods” 2015, vol. 7, s. 7715–7723. <https://doi.org/10.1039/C5AY00910C>.
- [58] Wang J., Wu C., Hu N., Zhou J., Du L., Wang P., *Microfabricated Electrochemical Cell-Based Biosensors for Analysis of Living Cells In Vitro*, „Biosensors” (Basel) 2012, vol. 2, s. 127–170. <https://doi.org/10.3390/BIOS2020127>.
- [59] Stolwijk J.A., Matrougui K., Renken C.W., Trebak M., *Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements*, „Pflügers Archiv: European Journal of Physiology” 2015, vol. 467, s. 2193–2198. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1674-0>.
- [60] Arman S., Tilley R.D., Gooding J.J., *A review of electrochemical impedance as a tool for examining cell biology and subcellular mechanisms: merits, limits, and future prospects*, „Analyst” 2024, vol. 149, s. 269–289. <https://doi.org/10.1039/D3AN01423A>.
- [61] Stensaas S.S., Stensaas L.J., *Histopathological evaluation of materials implanted in the cerebral cortex*, „Acta Neuropathologica” 1978, vol. 41, s. 145–55. <https://doi.org/10.1007/BF00689766>.
- [62] Scholten K., Meng E., *Materials for microfabricated implantable devices: a review*, „Lab on a Chip” 2015, vol. 15, s. 4256–4272. <https://doi.org/10.1039/C5LC00809C>.
- [63] Shapiro H.M., *The evolution of cytometers*, „Cytometry. Part A” 2004, vol. 58A, s. 13–20. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.10111>.
- [64] Ateya D.A., Erickson J.S., Howell P.B., Hilliard L.R., Golden J.P., Ligler F.S., *The good, the bad, and the tiny: A review of microflow cytometry*, „Analytical and Bioanalytical Chemistry” 2008, vol. 391, s. 1485–1498. <https://doi.org/10.1007/S00216-007-1827-5>.
- [65] Wang J. et al., *Microfluidic-based electrically driven particle manipulation techniques for biomedical applications*, „Royal Society of Chemistry (RSC) Advances” 2025, vol. 15, s. 167–198. <https://doi.org/10.1039/D4RA05571C>.
- [66] Lin S., Feng D., Han X., Li L., Lin Y., Gao H., *Microfluidic platform for omics analysis on single cells with diverse morphology and size: A review*, „Analytica Chimica Acta” 2024, vol. 1294, 342217. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2024.342217>.
- [67] Liu X., Zheng X., *Microfluidic-Based Electrical Operation and Measurement Methods in Single-Cell Analysis*, „Sensors” 2024, vol. 24, 6359. <https://doi.org/10.3390/S24196359>.

- [68] Wilkinson M.G., *Flow Cytometry in Microbiology: Technology and Applications*, Caister Academic Press, Norfolk 2015. <https://doi.org/10.21775/9781910190111>.
- [69] Freshney R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Sixth Edition, John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>.
- [70] Butement J.T. et al., *Discrimination of Microplastics and Phytoplankton Using Impedance Cytometry*, „ACS Sensors” 2024, vol. 9, s. 5206–5213. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c01353>.
- [71] Walczak R., Śniadek P., Dziuban J.A., Kluger J., Soyta A.C., *Supravital fluorometric apoptosis detection in a single mouse embryo using lab-on-a-chip*, „Lab on a Chip” 2011, vol. 11, s. 3263–3268. <https://doi.org/10.1039/C0LC00667J>.
- [72] Walczak R. et al., *Lab-on-a-chip spectrophotometric characterization of porcine oocytes*, „Sensors & Actuators, B: Chemical” 2012, vol. 165, s. 38–43. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2012.02.001>.
- [73] Walczak R., *Laboratoria chipowe z detekcją optyczną konstrukcja technologia i przykłady wykorzystania*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2014.
- [74] Katoh T.A., Fukai Y.T., Ishibashi T., *Optical microscopic imaging, manipulation, and analysis methods for morphogenesis research*, „Microscopy” 2024, vol. 73, s. 226–242. <https://doi.org/10.1093/JMICRO/DFAD059>.
- [75] Keller P.J., *Imaging morphogenesis: Technological advances and biological insights*, „Science” (1979) 2013, vol. 340. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1234168>.
- [76] Maška M. et al., *The Cell Tracking Challenge: 10 years of objective benchmarking*, „Nature Methods” 2023, vol. 20, s. 1010–1020. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01879-y>.
- [77] Hollandi R., Moshkov N., Paavolainen L., Tasnadi E., Piccinini F., Horvath P., *Nucleus segmentation: towards automated solutions*, „Trends in Cell Biology” 2022, vol. 32, s. 295–310. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2021.12.004>.
- [78] Hayashi S., Okada Y., *Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics*, „Molecular Biology of the Cell” 2015, vol. 26, s. 1743–1751. <https://doi.org/10.1091/MBC.E14-08-1287>.
- [79] Helmchen F., Denk W., *Deep tissue two-photon microscopy*, „Nature Methods” 2005, vol. 2, s. 932–940. <https://doi.org/10.1038/nmeth818>.
- [80] Denk W., Strickler J.H., Webb W.W., *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*, „Science” (1979) 1990, vol. 52, s. 1778–1779. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2321027>.
- [81] Wan Y., McDole K., Keller P.J., *Light-sheet microscopy and its potential for understanding developmental processes*, „Annual Review of Cell and Developmental Biology” 2019, vol. 35, s. 655–681. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100818-125311>.
- [82] Tomer R., Khairy K., Amat F., Keller P.J., *Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multiview light-sheet microscopy*, „Nature Methods” 2012, vol. 9, s. 755–763. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2062>.

- [83] Truong T.V., Supatto W, Koos DS, Choi JM, Fraser SE. *Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy*, „Nature Methods” 2011, vol. 8, s. 757–760. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1652>.
- [84] Miura K., Fukushi Y., *Scanning acoustic microscopy imaging of cellular structural and mechanical alterations from external stimuli*, „Heliyon” 2021, vol. 7, e07847. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07847>.
- [85] Issouckis M., *Imaging cells with acoustic microscopy*, „Nature” 1986, vol. 322, s. 91–92. <https://doi.org/10.1038/322091a0>.
- [86] Yin Y., Liu Z., *Microfluidic Technology for Measuring Mechanical Properties of Single Cells and Its Application*, „Bioengineering” 2024, vol. 11, 1266. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING11121266>.
- [87] Hao Y., Cheng S., Tanaka Y., Hosokawa Y., Yalikun Y., Li M., *Mechanical properties of single cells: Measurement methods and applications*, „Biotechnology Advances” 2020, vol. 45, 107648. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107648>.
- [88] Hou H.W., Li Q.S., Lee G.Y.H., Kumar A.P., Ong C.N., Lim C.T., *Deformability study of breast cancer cells using microfluidics*, „Biomedical Microdevices” 2009, vol. 11, s. 557–564. <https://doi.org/10.1007/S10544-008-9262-8>.
- [89] Otto O. *et al.*, *Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping*, „Nature Methods” 2015, vol. 12, s. 199–202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3281>.
- [90] Chen J. *et al.*, *Classification of cell types using a microfluidic device for mechanical and electrical measurement on single cells*, „Lab on a Chip” 2011, vol. 11, s. 3174–3181. <https://doi.org/10.1039/C1LC20473D>.
- [91] Storti F., Bonfadini S., Criante L., *Simplified 3D hydrodynamic flow focusing for lab-on-chip single particle study*, „Scientific Reports” 2023, vol. 13, 14671. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40430-z>.
- [92] Jones W.R, Ping Ting-Beall H., Lee G.M., Kelley S.S., Hochmuth R.M., Guilak F., *Alterations in the Young’s modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage*, „Journal of Biomechanics” 1999, vol. 32, s. 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00166-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00166-3).
- [93] Chan B.P, Li CH, Au-Yeung KL, Sze KY, Ngan A.H.W., *A microplate compression method for elastic modulus measurement of soft and viscoelastic collagen microspheres*, „Annals of Biomedical Engineering” 2008, vol. 36, s. 1254–1267. <https://doi.org/10.1007/S10439-008-9507-Y>.
- [94] Dudani J.S., Gossett D.R., Tse H.T.K., Di Carlo D., *Pinched-flow hydrodynamic stretching of single-cells*, „Lab on a Chip” 2013, vol. 13, s. 3728–3734. <https://doi.org/10.1039/C3LC50649E>.
- [95] Kang J.H. *et al.*, *Noninvasive monitoring of single-cell mechanics by acoustic scattering*, „Nature Methods” 2019, vol. 16, s. 263–269. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0326-x>.
- [96] Solon J. *et al.*, *Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates*, „Biophysical Journal” 2007, vol. 93, 4453–4461. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.101386>.

- [97] Lekka M., Laidler P., *Applicability of AFM in cancer detection*, „Nature Nanotechnology” 2009, vol. 4, s. 72. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.004>.
- [98] Sun W. *et al.*, *Precise determination of elastic modulus of cell using conical AFM probe*, „Journal of Biomechanics” 2021, vol. 118, 110277. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2021.110277>.
- [99] Holuigue H. *et al.*, *Force Sensing on Cells and Tissues by Atomic Force Microscopy*, „Sensors” 2022, vol. 22, 2197. <https://doi.org/10.3390/S22062197>.
- [100] Schuhmann W., Schulte A., *Single-Cell Microelectrochemistry*, „Angewandte Chemie International Edition” 2007, vol. 46, s. 8760–8777. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200604851>.
- [101] Zhang J. *et al.*, *New Frontiers and Challenges for Single-Cell Electrochemical Analysis*, „ACS Sensors” 2018, vol. 3, s. 242–250. [https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.7B00711/ASSET/IMAGES/MEDIUM/SE-2017-00711Q\\_0005.GIF](https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.7B00711/ASSET/IMAGES/MEDIUM/SE-2017-00711Q_0005.GIF).
- [102] Huang K. *et al.*, *Application and outlook of electrochemical technology in single-cell analysis*, „Biosensors and Bioelectronics” 2023, vol. 242, 115741. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2023.115741>.
- [103] Tian Z., Wang X., Chen J., *On-chip dielectrophoretic single-cell manipulation*, „Microsystems & Nanoengineering” 2024, vol. 10, 117. <https://doi.org/10.1038/s41378-024-00750-0>.
- [104] Hunt T.P., Issadore D., Westervelt R.M., *Integrated circuit/microfluidic chip to programmably trap and move cells and droplets with dielectrophoresis*, „Lab on a Chip” 2007, vol. 8, s. 81–87. <https://doi.org/10.1039/B710928H>.
- [105] Jubery T.Z., Srivastava S.K., Dutta P., *Dielectrophoretic separation of bioparticles in microdevices: A review*, „Electrophoresis” 2014, vol. 35, s. 691–713. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201300424>.
- [106] Li H., Fu Y., Guo J., *Impedance Cell Sensing Technology From Single-Frequency to Multifrequency: A Review*, „IEEE Sensors Journal” 2024, vol. 24, s. 4150–4160. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2023.3347539>.
- [107] Moghtaderi H. *et al.*, *Electrical impedance sensing in stem cell research: Insights, applications, and future directions*, „Progress in Biophysics and Molecular Biology” 2025, vol. 195, s. 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2024.11.004>.
- [108] Zhang Z. *et al.*, *Recent Advances in Electrical Impedance Sensing Technology for Single-Cell Analysis*, „Biosensors” (Basel) 2021, vol. 11, s. 470. <https://doi.org/10.3390/BIOS11110470>.
- [109] Mihaela G., *A short review on cell-based biosensing: challenges and breakthroughs in biomedical analysis*, „The Journal of Biomedical Research” 2021, vol. 35, s. 255–263. <https://doi.org/10.7555/JBR.34.20200128>.
- [110] Sun T., Morgan H., *Single-cell microfluidic Impedance cytometry: A review*, „Microfluid Nanofluidics” 2010, vol. 8, s. 423–443. <https://doi.org/10.1007/S10404-010-0580-9/TABLES/1>.
- [111] Cheung K.C. *et al.*, *Microfluidic impedance-based flow cytometry*, „Cytometry A” 2010, vol. 77A, s. 648–666. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20910>.
- [112] Brzózka Z., Malinowska E., Wróblewski W., red., *Sensory chemiczne i biosensory*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2022.

- [113] Pound B.G., *The use of electrochemical techniques to evaluate the corrosion performance of metallic biomedical materials and devices*, „Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials” 2019, vol. 107, s. 1189–1198. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.34212>.
- [114] Gilbert J.L., *Electrochemical behavior of metals in the biological milieu*, „Comprehensive Biomaterials” 2011, vol. 1, s. 21–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00013-1>.
- [115] Uwais Z.A., Hussein M.A., Samad M.A., Al-Aqeeli N., *Surface modification of metallic biomaterials for better tribological properties: A review*, „Arabian Journal for Science and Engineering” 2017, vol. 42, s. 4493–4512. <https://doi.org/10.1007/S13369-017-2624-X/METRICS>.
- [116] Chen Q., Thouas G.A., *Metallic implant biomaterials*, „Materials Science and Engineering. R: Reports” 2015, vol. 87, s. 1–57. <https://doi.org/10.1016/J.MSER.2014.10.001>.
- [117] Manam N.S. et al., *Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review*, „Journal of Alloys and Compounds” 2017, vol. 701, s. 698–715. <https://doi.org/10.1016/J.JALLCOM.2017.01.196>.
- [118] Marciniak J., *Biomateriały*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2013.
- [119] Williams D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*, „Biomaterials” 2008, vol. 29, s. 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.04.023>.
- [120] Johnson A., Shiraishi T., *Biocompatibility of precious metals for medical applications. Precious Metals for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing, Cambridge 2014, s. 37–55. <https://doi.org/10.1533/9780857099051.1.37>.
- [121] Kohane D.S., Langer R., *Biocompatibility and drug delivery systems*, „Chemical Science” 2010, vol. 1, s. 441–446. <https://doi.org/10.1039/C0SC00203H>.
- [122] Khan W., Muntimadugu E., Jaffe M., Domb A.J., *Implantable Medical Devices. Focal Controlled Drug Delivery*, Springer, Boston 2014, s. 33–59. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9434-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9434-8_2).
- [123] Matusiewicz H., *Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles – A systematic analytical review*, „Acta Biomaterialia” 2014, vol. 10, s. 2379–2403. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2014.02.027>.
- [124] U.S. Food and Drug Administration (FDA), *Biological responses to metal implants*, USA 2019.
- [125] Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press, London 2014. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07884-5>.
- [126] Major M.R., Wong V.W., Nelson E.R., Longaker M.T., Gurtner G.C., *The foreign body response: at the interface of surgery and bioengineering*, „Plastic and Reconstructive Surgery” 2015, vol. 135, s. 1489–1498. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000001193>.
- [127] Clark G.M. et al., *Biomedical studies on temporal bones of the first multi-channel cochlear implant patient at the University of Melbourne*, „Cochlear Implants International” 2014, vol. 15, s. 1–15. <https://doi.org/10.1179/1754762814Y.00000000087>.

- [128] Nadol J.B., O'Malley J.T., Burgess B.J., Galler D., *Cellular immunologic responses to cochlear implantation in the human*, „Hearing Research” 2014, vol. 318, s. 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.HEARES.2014.09.007>.
- [129] O'Malley J.T., Burgess B.J., Galler D., Nadol J.B., *Foreign body response to silicone in cochlear implant electrodes in the human*, „Otolology and Neurotology” 2017, vol. 38, s. 970–977. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000001454>.
- [130] Schmidt M. *et al.*, *Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel*, „Nature Immunology” 2010, vol. 11, s. 814–819. <https://doi.org/10.1038/NI.1919>.
- [131] EN ISO 10993, *Biologiczna ocena wyrobów medycznych*, 2010.
- [132] *F2129 Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices* n.d., <https://www.astm.org/f2129-19a.html> (dostęp: 11.11.2024).
- [133] Szypulski M., Zarzeczny D., Lizak T., Muzyka K., Kociubiński A., Prendecka M., Małecka-Massalska T., *Design and technology of copper comb capacitors*, [w:] R.S. Romaniuk, M. Linczuk, eds. *Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments 2018*, „Proceedings of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers” 2018, vol. 10808. <https://doi.org/10.1117/12.2501736>.
- [134] Zarzeczny D. *et al.*, *Design and technology of titanium comb capacitor*, [w:] R.S. Romaniuk, M. Linczuk, eds. *Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments 2018*, „Proceedings of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers” 2018, vol. 10808. <https://doi.org/10.1117/12.2501551>.
- [135] Kociubiński A., *Electric cell-substrate impedance sensing in biocompatibility research*, „Journal of Electrical Bioimpedance” 2021, vol. 12, s. 163–168. <https://doi.org/10.2478/JOEB-2021-0019>.
- [136] Asami K., *Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy*, „Journal of Non-Crystalline Solids” 2002, vol. 305, s. 268–277. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(02\)01110-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(02)01110-9).
- [137] Kociubiński A. *et al.*, *Real-time monitoring of cell cultures with nickel comb capacitors*, „Informatyka, Automatyka, Pomiary w Gospodarce i Ochronie Środowiska” 2020, vol. 10, s. 32–35. <https://doi.org/10.35784/iapgos.1564>.
- [138] ATCC: The Global Bioresource Center | ATCC n.d. <https://www.atcc.org> (dostęp: 26.12.2024).
- [139] Szulcek R., Bogaard H.J., van Nieuw Amerongen G.P., *Electric cell-substrate impedance sensing for the quantification of endothelial proliferation, barrier function, and motility*, „Journal of Visualized Experiments” 2014, vol. 85, 51300. <https://doi.org/10.3791/51300>.
- [140] Khorasani A.M., Goldberg M., Doeven E.H., Littlefair G., *Titanium in Biomedical Applications – Properties and Fabrication: A Review*, „Journal of Biomaterials and Tissue Engineering” 2015, vol. 5, s. 593–619. <https://doi.org/10.1166/JBT.2015.1361>.

- [141] Engel N. et al., *Combining Electrostimulation with Impedance Sensing to Promote and Track Osteogenesis within a Titanium Implant*, „Biomedicines” 2023, vol. 11, 697. <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES11030697>.
- [142] Petley V., Sathishkumar S., Thulasi Raman K.H., Rao G.M., Chandrasekhar U., *Microstructural and mechanical characteristics of Ni–Cr thin films*, „Materials Research Bulletin” 2015, vol. 66, s. 59–64. <https://doi.org/10.1016/J.MATERRESBULL.2015.02.002>.
- [143] Vinayak S., Vyas H.P., Vankar V.D., *Microstructure and electrical characteristics of Ni–Cr thin films*, „Thin Solid Films” 2007, vol. 515, s. 7109–7116. <https://doi.org/10.1016/J.TSF.2007.03.011>.
- [144] Kazi I.H., Wild P.M., Moore T.N., Sayer M., *Characterization of sputtered nichrome (Ni–Cr 80/20 wt.%) films for strain gauge applications*, „Thin Solid Films” 2006, vol. 515, s. 2602–2606. <https://doi.org/10.1016/J.TSF.2005.10.077>.
- [145] Kociubiński A., Zarzeczny D., Prendecka M., Pigoń D., Małecka-Massalska T., *Nichrome Capacitors on Polycarbonate Substrate for Monitoring Cell Culture Using Impedance Sensing Technique*, „Archives of Metallurgy and Materials” 2020, vol. 65, s. 493–496. <https://doi.org/10.24425/amm.2020.131752>.
- [146] Azizipour N., Avazpour R., Rosenzweig D.H., Sawan M., Ajji A., *Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip*, „Micromachines” (Basel) 2020, vol. 11, 599. <https://doi.org/10.3390/MI11060599>.
- [147] Kulkarni M.B., Goel S., *Recent advancements in integrated microthermofluidic systems for biochemical and biomedical applications – A review*, „Sensors and Actuators A: Physical” 2022, vol. 341, 113590. <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2022.113590>.
- [148] Zhang Z., Wang X., Yan Y., *A review of the state-of-the-art in electronic cooling*, „E-Prime – Advances in Electrical Engineering, Electronics and Energy” 2021, vol. 1, 100009. <https://doi.org/10.1016/J.PRIME.2021.100009>.
- [149] Yu Z.Q., Li M.T., Cao B.Y., *A comprehensive review on microchannel heat sinks for electronics cooling*, „International Journal of Extreme Manufacturing” 2024, vol. 6, 022005. <https://doi.org/10.1088/2631-7990/AD12D4>.
- [150] Raj E., Paciello S., *Power Diode Packages with Embedded Microchannel Cooler: Is Further Improvement Possible? [w:] Proceedings of 2024 IEEE 18<sup>th</sup> International Conference on Compatibility, Power Electronics and Power Engineering (CPE-POWERENG)*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) 2001. <https://doi.org/10.1109/CPE-POWERENG60842.2024.10604295>.
- [151] Feng S. et al., *Review on Smart Gas Sensing Technology*, „Sensors” 2019, vol. 19, 3760. <https://doi.org/10.3390/S19173760>.
- [152] Chung W.Y. et al., *An implementation of an electronic tongue system based on a multi-sensor potentiometric readout circuit with embedded calibration and temperature compensation*, „Microelectronics Journal” 2016, vol. 57, s. 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.MEJO.2016.08.010>.
- [153] Hsieh T.M., Luo C.H., Huang F.C., Wang J.H., Chien L.J., Lee G.B., *Enhancement of thermal uniformity for a microthermal cyclor and its application for polymerase chain reaction*, „Sensors & Actuators, B: Chemical” 2008, vol. 130, s. 848–856. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2007.10.063>.

- [154] Darhuber A.A., Valentino J.P., Troian S.M., *Planar digital nanoliter dispensing system based on thermocapillary actuation*, „Lab on a Chip” 2010, vol. 10, s. 1061–1071. <https://doi.org/10.1039/B921759B>.
- [155] Velve Casquillas G. *et al.*, *Fast microfluidic temperature control for high resolution live cell imaging*, „Lab on a Chip” 2011, vol. 11, s. 484–489. <https://doi.org/10.1039/C0LC00222D>.
- [156] Yang J. *et al.*, *High sensitivity PCR assay in plastic micro reactors*, „Lab on a Chip” 2002, vol. 2, s. 179–187. <https://doi.org/10.1039/B208405H>.
- [157] Matsui T., Franzke J., Manz A., Janasek D., *Temperature gradient focusing in a PDMS/glass hybrid microfluidic chip*, „Electrophoresis” 2007, vol. 28, s. 4606–4611. <https://doi.org/10.1002/ELPS.200700272>.
- [158] De Schoenmacker I., Archibald J., Kramer J.L.K., Hubli M., *Improved acquisition of contact heat evoked potentials with increased heating ramp*, „Scientific Reports” 2022, vol. 12, 925. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04867-y>.
- [159] Chauhan N.S., Mori T., *Cooler, stronger, smaller: improving thermoelectric cooling*, „National Science Review” 2024, vol. 12. <https://doi.org/10.1093/NSR/NWAE445>.
- [160] Hettiarachchi K., Kim H., Faris G.W., *Optical manipulation and control of real-time PCR in cell encapsulating microdroplets by IR laser*, „Microfluid Nanofluidics” 2012, vol. 13, s. 967–975. <https://doi.org/10.1007/S10404-012-1016-5>.
- [161] Robert De Saint Vincent M., Wunenburger R., Delville J.P., *Laser switching and sorting for high speed digital microfluidics*, „Applied Physics Letters” 2008, vol. 92, 154105. <https://doi.org/10.1063/1.2911913>.
- [162] Weinert F.M., Braun D., *Optically driven fluid flow along arbitrary microscale patterns using thermoviscous expansion*, „Journal of Applied Physics” 2008, vol. 104, 154105. <https://doi.org/10.1063/1.3026526>.
- [163] Guijt R.M., Dodge A., Van Dedem G.W.K., De Rooij N.F., Verpoorte E., *Chemical and physical processes for integrated temperature control in microfluidic devices*, „Lab on a Chip” 2003, vol. 3, s. 1–4. <https://doi.org/10.1039/B210629A>.
- [164] Maltezos G., Rajagopal A., Scherer A., *Evaporative cooling in microfluidic channels*, „Applied Physics Letters” 2006, vol. 89, 074107. <https://doi.org/10.1063/1.2234318/332574>.
- [165] Shah J.J., Geist J., Gaitan M., *Microwave-induced adjustable nonlinear temperature gradients in microfluidic devices*, „Journal of Micromechanics and Microengineering” 2010, vol. 20, 105025. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/20/10/105025>.
- [166] Kempitiya A., Borca-Tasciuc D.A., Mohamed H.S., Hella M.M., *Localized microwave heating in microwells for parallel DNA amplification applications*, „Applied Physics Letters” 2009, vol. 94. <https://doi.org/10.1063/1.3078273/121180>.
- [167] Shah J.J., *Microwave dielectric heating of fluids in an integrated microfluidic device*, „Journal of Micromechanics and Microengineering” 2007, vol. 17, 2224. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/17/11/008>.
- [168] Issadore D., Humphry K.J., Brown K.A., Sandberg L., Weitz D.A., Westervelt R.M., *Microwave dielectric heating of drops in microfluidic devices*, „Lab on a Chip” 2009, vol. 9, s. 1701–1706. <https://doi.org/10.1039/B822357B>.

- [169] Vernon J. *et al.*, *Acousto-Pi: An Opto-Acoustofluidic System Using Surface Acoustic Waves Controlled with Open-Source Electronics for Integrated In-Field Diagnostics*, „IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control” 2022, vol. 69, s. 411–422. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2021.3113173>.
- [170] Shilton R.J. *et al.*, *Rapid and Controllable Digital Microfluidic Heating by Surface Acoustic Waves*, „Advanced Functional Materials” 2015, vol. 25, s. 5895–5901. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201501130>.
- [171] Jain A., Goodson K.E., *Thermal microdevices for biological and biomedical applications*, „Journal of Thermal Biology” 2011, vol. 36, s. 209–218. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2011.02.006>.
- [172] Jeroish Z.E., Bhuvaneshwari K.S., Samsuri F., Narayanamurthy V., *Microheater: material, design, fabrication, temperature control, and applications – a role in COVID-19*, „Biomedical Microdevices” 2022, vol. 24, 3. <https://doi.org/10.1007/S10544-021-00595-8>.
- [173] Spruit R.G., Tijn Van Omme J., Ghatkesar M.K., Hugo Pérez Garza H., *A review on development and optimization of microheaters for high-temperature in situ studies*, „Journal of Microelectromechanical Systems” 2017, vol. 26, s. 1165–1182. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2017.2757402>.
- [174] Ejeian F. *et al.*, *Design and applications of MEMS flow sensors: A review*, „Sensors and Actuators A: Physical” 2019, vol. 295, s. 483–502. <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2019.06.020>.
- [175] Paun C., Tomescu R., Cristea D., Ionescu O., Parvulescu C., *Design, fabrication and characterization of a micro-heater for metasurface-based gas sensors*. [w:] *Proceedings of the International Semiconductor Conference, CAS 2020; 2020-October*: s. 31–34. <https://doi.org/10.1109/CAS50358.2020.9267975>.
- [176] Bagga S., Akhtar J., Mishra S., Preeti, *Fabrication of coplanar microheater platform for LPG sensing applications*. „Microsystem Technologies” 2019, vol. 26, s. 731–738. <https://doi.org/10.1007/S00542-019-04586-X>.
- [177] Ricci P.P., Gregory O.J., *Free-standing, thin-film sensors for the trace detection of explosives*, „Scientific Reports” 2021, vol. 11, 6623. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86077-6>.
- [178] Rezanian A., Rosendahl L.A., *Thermal effect of a thermoelectric generator on parallel microchannel heat sink*, „Energy” 2012, vol. 37, s. 220–227. <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2011.11.043>.
- [179] Hernandez C.A., Beni V., Osma J.F., *Fully Automated Microsystem for Unmediated Electrochemical Characterization, Visualization and Monitoring of Bacteria on Solid Media; E. coli K-12: A Case Study*, „Biosensors” (Basel) 2019, vol. 9, s. 131. <https://doi.org/10.3390/BIOS9040131>.
- [180] Zhang L., Ding B., Chen Q., Feng Q., Lin L., Sun J., *Point-of-care-testing of nucleic acids by microfluidics*, „TrAC: Trends in Analytical Chemistry” 2017, vol. 94, s. 106–116. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.07.013>.
- [181] Kulkarni M.B., Yashas, Vyas R., *A role of integrated microheaters in a microfluidics based point-of-care-testing and beyond for healthcare applications*, „Applied Materials Today” 2024, vol. 38, s. 102225. <https://doi.org/10.1016/J.APMT.2024.102225>.

- [182] Miralles V., Huerre A., Malloggi F., Jullien M.C., *A Review of Heating and Temperature Control in Microfluidic Systems: Techniques and Applications*, „Diagnostics” 2013, vol. 3, s. 33–67. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS3010033>.
- [183] Veltkamp H.W., Monteiro F.A., Sanders R., Wiegerink R., Lötters J., *Disposable DNA Amplification Chips with Integrated Low-Cost Heaters*, „Micromachines” (Basel) 2020, vol. 11, 238. <https://doi.org/10.3390/MI11030238>.
- [184] Osiander R., Darrin M.A.G., Champion J.L., *MEMS and Microstructures in Aerospace Applications*, CRC Press, Boca Raton 2006. <https://doi.org/10.1201/9781420027747>.
- [185] Osiander R., Firebaugh S.L., Champion J.L., Farrar D., *Darrin MAG. Microelectromechanical devices for satellite thermal control*, „IEEE Sensors Journal” 2004, vol. 4, s. 525–531. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2004.830297>.
- [186] VanHorn A., Zhou W., *Design and optimization of a high temperature microheater for inkjet deposition*, „The International Journal of Advanced Manufacturing Technology” 2016, vol. 86, s. 3101–3111. <https://doi.org/10.1007/S00170-016-8440-8>.
- [187] Scorzoni A. *et al.*, *Design and experimental characterization of thin film heaters on glass substrate for Lab-on-Chip applications*, „Sensors and Actuators A: Physical” 2015, vol. 229, s. 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2015.03.011>.
- [188] Hwang W.J., Shin K.S., Roh J.H., Lee D.S., Choa S.H., *Development of Micro-Heaters with Optimized Temperature Compensation Design for Gas Sensors*, „Sensors” 2011, vol. 11, s. 2580–2591. <https://doi.org/10.3390/S110302580>.
- [189] Khanna V.K., Prasad M., Dwivedi V.K., Shekhar C., Pankaj A.C., Basu J., *Design and electro-thermal simulation of a polysilicon microheater on a suspended membrane for use in gas sensing*, „Indian Journal of Pure & Applied Physics” 2007, vol. 45, s. 332–335.
- [190] Prasad M., Yadav R.P., Sahula V., Khanna V.K., *Design and Simulation of Double-spiral Shape Micro-heater for Gas Sensing Applications*, „Sensors & Transducers Journal” 2011, vol. 129, s. 135–141.
- [191] Bobinger M.R. *et al.*, *Flexible and robust laser-induced graphene heaters photothermally scribed on bare polyimide substrates*, „Carbon” 2019, vol. 144, s. 116–126. <https://doi.org/10.1016/J.CARBON.2018.12.010>.
- [192] Deekla P., Phatthanakun R., Sujitjorn S., Chomnawang N., *Al Microheater and Ni Temperature Sensor Set based-on Photolithography with Closed-Loop Control*, „International Journal of Electrical and Computer Engineering” 2015, vol. 5, s. 849–858. <https://doi.org/10.11591/IJECE.V5I4.PP849-858>.
- [193] Li X., Huang Y., Chen X., Xu X., Xiao D., *Electro-thermal analysis of an Al-Ti multilayer thin film microheater for MEMS thruster application*, „Microsystem Technologies” 2018, vol. 24, s. 2409–2417. <https://doi.org/10.1007/S00542-017-3649-5>.
- [194] Chang W.-Y., Hsihe Y.-S., *Multilayer microheater based on glass substrate using MEMS technology*, „Microelectronic Engineering” 2016, vol. 149, s. 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2015.09.005>.

- [195] Je J., Lee J., *Design, fabrication, and characterization of liquid metal microheaters*, „Journal of Microelectromechanical Systems” 2014, vol. 23, s. 1156–1163. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2014.2307358>.
- [196] Nieto D., McGlynn P., de la Fuente M., Lopez-Lopez R., O'Connor G.M., *Laser microfabrication of a microheater chip for cell culture outside a cell incubator*, „Colloids and Surfaces B: Biointerfaces” 2017, vol. 154, s. 263–269. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.03.043>.
- [197] Yoon D.S. *et al.*, *Precise temperature control and rapid thermal cycling in a micromachined DNA polymerase chain reaction chip*, „Journal of Micromechanics and Microengineering” 2002, vol. 12, 813. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/12/6/312>.
- [198] Lee C. Y., Lee G.B., Lin J.L., Huang F.C., Liao C.S., *Integrated microfluidic systems for cell lysis, mixing/pumping and DNA amplification*, „Journal of Micromechanics and Microengineering” 2005, vol. 15, 1215. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/15/6/011>.
- [199] Caputo D., De Cesare G., Nascetti A., Scipintti R., *a-Si:H temperature sensor integrated in a thin film heater*, „Physica Status Solidi A” 2010, vol. 207, s. 708–711. <https://doi.org/10.1002/PSSA.200982719>.
- [200] Han J.W., Meyyappan M., *A Built-In Temperature Sensor in an Integrated Microheater*, „IEEE Sensors Journal” 2016, vol. 16, s. 5543–5547. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2016.2569445>.
- [201] Randjelović D. *et al.*, *Multipurpose MEMS thermal sensor based on thermopiles*, „Sensors and Actuators A: Physics” 2008, vol. 141, s. 404–413. <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2007.10.043>.
- [202] Im D.H., Yoon T.W., Min W.S., Hong S.J., *Fabrication of Planar Heating Chuck Using Nichrome Thin Film as Heating Element for PECVD Equipment*, „Electronics” 2021, vol. 10, 2535. <https://doi.org/10.3390/ELECTRONICS10202535>.
- [203] Zhai D., Chen Y., Zhai H., Liu Y., *Fabrication and characterization of NiCr-based films with high resistivity and low temperature coefficient of resistance*, „Nanotechnology and Precision Engineering” 2023, vol. 6, 023004. <https://doi.org/10.1063/10.0017693>.
- [204] Curtis T.M. *et al.*, *Suitability of invertebrate and vertebrate cells in a portable impedance-based toxicity sensor: Temperature mediated impacts on long-term survival*, „Toxicology in Vitro” 2013, vol. 27, s. 2061–2066. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.07.007>.
- [205] Pennington M.R., Van de Walle G.R., *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing To Monitor Viral Growth and Study Cellular Responses to Infection with Alphaherpesviruses in Real Time*, „mSphere” 2017, vol. 2, s. 39–56. <https://doi.org/10.1128/msphere.00039-17>.
- [206] Guiseppi-Elie A., Koch L., Finley S.H., Wnek G.E., *The effect of temperature on the impedimetric response of bioreceptor hosting hydrogels*, „Biosensors and Bioelectronics” 2011, vol. 26, s. 2275–2280. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.050>.

- [207] Campbell C.E., Laane M.M., Haugarvoll E., Giaever I., *Monitoring viral-induced cell death using electric cell-substrate impedance sensing*, „Biosensors and Bioelectronics” 2007, vol. 23, s. 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.06.015>.
- [208] Lo C.M., Ferrier J., *Impedance analysis of fibroblastic cell layers measured by electric cell-substrate impedance sensing*, „Physical Review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics E” 1998, vol. 57, s. 6982–6987. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.57.6982>.
- [209] Xie X. et al., *In vitro hyperthermia studied in a continuous manner using electric impedance sensing*, „Royal Society of Chemistry (RSC) Advances” 2015, vol. 5, s. 62007–62016. <https://doi.org/10.1039/C5RA04743a>.
- [210] Kociubiński A., *Technologia przyrządów półprzewodnikowych w optycznych pomiarach właściwości cieczy*, Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej, Lublin 2017.
- [211] Kociubiński A., *Modeling, simulation and characterization of aluminum implantation in 4H-SiC for large-area photodiode technology*, „Acta Physica Polonica A” 2017, vol. 132, s. 225–228. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.132.225>.
- [212] Bechtold T., Schrag G., Feng L., *System-level modeling of MEMS*, Wiley-VCH, Weinheim 2013. <https://doi.org/10.1002/9783527647132>.
- [213] Lizak T., Szypulski M., Zarzeczny D., Muzyka K., Kociubiński A., *Modeling and simulation of nichrome microheater on polycarbonate substrate*, [w:] R.S. Romaniuk, M. Linczuk, eds., *Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments 2018*, „Proceedings of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers” 2018, vol. 10808, s. 124. <https://doi.org/10.1117/12.2501556>.
- [214] Boateng J., Catanzano O., *Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing – A Review*, „Journal of Pharmaceutical Sciences” 2015, vol. 104, s. 3653–3680. <https://doi.org/10.1002/JPS.24610>.
- [215] Stamm A., Reimers K., Strauß S., Vogt P., Scheper T., Pepelanova I., *In vitro wound healing assays – State of the art*, „BioNanoMaterials” 2016, vol. 17, s. 79–87. <https://doi.org/10.1515/BNM-2016-0002>.
- [216] Ouahoud S., Giugliano F.P., Muncan V., *Monitoring Intestinal Organoid-Derived Monolayer Barrier Functions with Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)*, „Bio-protocol” 2024, vol. 14, e4947. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.4947>.
- [217] Liang C.C., Park A.Y., Guan J.L., *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*, „Nature Protocols” 2007, vol. 2, s. 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.
- [218] Jonkman J.E.N. et al., *An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy*, „Cell Adhesion & Migration” 2014, vol. 8, s. 440–451. <https://doi.org/10.4161/CAM.36224>.
- [219] Yue P.Y.K., Leung E.P.Y., Mak N.K., Wong R.N.S., *A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates*, „Journal of Biomolecular Screening” 2010, vol. 15, s. 427–433. <https://doi.org/10.1177/1087057110361772>.

- [220] Hettler A., Werner S., Eick S., Laufer S., Weise F., *A New In Vitro Model to Study Cellular Responses after Thermomechanical Damage in Monolayer Cultures*, „PLOS One” 2013, vol. 8, e82635. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0082635>.
- [221] Keese C.R., Wegener J., Walker S.R., Giaever I., *Electrical wound-healing assay for cells in vitro*, „Proceedings of the National Academy of Sciences USA” 2004, vol. 101, s. 1554–1559. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0307588100>.
- [222] Gamal W. et al., *Real-time quantitative monitoring of hiPSC-based model of macular degeneration on Electric Cell-substrate Impedance Sensing microelectrodes*, „Biosensors and Bioelectronics” 2015, vol. 71, s. 445–455. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.04.079>.
- [223] Zordan M.D., Mill C.P., Riese D.J., Leary J.F., *A high throughput, interactive imaging, bright-field wound healing assay*, „Cytometry A” 2011, vol. 79, s. 227–232. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.21029>.
- [224] Kociubiński A. et al., *Impedance Measurement for the Monitoring of In Vitro Cells Cultured in the Presence of Electromagnetic Waves*, „Applied Sciences” 2023, vol. 13, 1267. <https://doi.org/10.3390/APP13031267>.

