



بیست و پنجمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و یازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه شیراز،
شیراز، ایران.
۱۳۹۷ بهمن ۹-۱۱



ساخت بایو حسگر پلاسمونی دو بعدی با هدف تحریک لیزری سلول عصبی موش

سعیدی فرد، ساجده^۱؛ سهرابی، فوزیه^۱؛ قاضی مرادی، محمدحسین^۲؛ حمیدی، سیده مهری^{۱*}؛ فریور، شیرین^۲؛ انصاری، محمدعلی^۳

^۱ آزمایشگاه مگنتوپلاسمونیک، پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران

^۲ دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران

^۳ آزمایشگاه تصویربرداری نوری، پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران.

چکیده - پیشرفت در تکنولوژی دیود لیزری امکان تحریک عصبی مادون قرمز را فراهم آورده است. در این مقاله به بررسی تاثیر تحریک لیزری سلول Herpg Hodode (سلول عصبی انتهای کلون روده) در ناحیه ی ایمن فروسرخ نزدیک (۱۴۵۰ نانومتر) پرداخته ایم که بر روی بستره ی نانو توری پلاسمونیکی دوبعدی کشت شده است. بدین منظور یک ساختار پلاسمونیکی که شامل طلا بر روی نانوتوری دو بعدی است، به روش لایه نشانی گرمایی تهیه شده و پس از کشت سلول عصبی مورد نظر، تاثیر تحریک پالس لیزری با استفاده از روش بیضی سنجی در بازه ی زمانی ثابت ۵ میلی ثانیه و بازه ی فرکانسی ۳، ۵ و ۷ هرتز بر سلول عصبی بررسی شده است. نتایج حاصل، نشان دهنده ی حساسیت فرکانسی ساختار در چند طول موج کاربردی است که میتوان جهت تیمار فوتو گرمایی استفاده کرد.

کلید واژه- تحریک لیزری سلول، کشت سلولی، نانوتوری پلاسمونیکی دو بعدی، فروسرخ نزدیک.

Fabrication of two-dimensional plasmonic bio-sensor as detector of Laser stimulation of mouse neural cell

Saeidifard, Sajede¹; Sohrabi, Foozieh¹; Ghazimoradi, Mohammad Hossein²; Hamidi, Seyedeh Mehri^{1*}; Farivar, Shirin²; Ansari, Mohammad Ali³

¹Magneto-plasmonic lab, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

²Life science and biotechnology faculty, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

³Optical Bio-imaging Lab, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
m_hamidi@sbu.ac.ir

Abstract- Advances in laser diode technology have allowed infrared nerve stimulation. In this paper, we investigated the effect of laser stimulation on Herpg Hodode cell (end of the intestine neural cell) in a near-infrared immune region (1450 nm) which has been cultured on a 2-D plasmonic nano grating template. For this purpose, a plasmonic structure consisting of gold onto a two-dimensional nano grating was prepared by thermal deposition method and after the culture of the desired neuron, the spectroscopy of the samples has been done under different polarizations, given angle, constant duration time of 5 ms and frequency ranges 3, 5 and 7 Hz. At the end, the effect of the pulsed laser has been investigated on the neural cell in various frequency conditions and reflection diagram in term of wavelength has been plotted.

Keywords: Cell culture, Laser cell stimulation, Near infrared, Two-dimensional plasmonic nano-grating

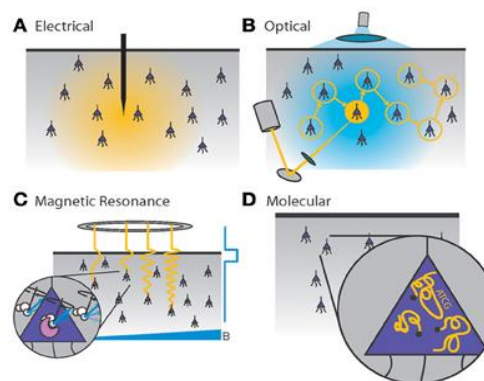
۱- مقدمه

در طول دهه ی گذشته، تکنیک های جدیدی توسعه یافته است که در آنها از نور برای تحریک نورون استفاده می شود. تکنیک های اخیر قادر به افزایش حساسیت نورون ها و تولید اسپایک های پتانسیل عمل در معرض قرار گرفتن لیزر با مقیاس زمانی ثانیه بوده است. این تکنیک ها شامل بهبود ژنتیکی نورون های مورد نظر برای معرفی گیرنده های نورونی حساس به نور و یا معرفی مولکول های متغیر با نور بوده است که به کانال های یونی خاصی متصل می شوند و زمانیکه در معرض نور قرار می گیرند، رفتار آنها تغییر می کند. در مقابل، پیشرفت در تکنولوژی دیود لیزری برای تحریک عصبی مادون قرمز اجازه ی استفاده از طول موج هایی را می دهد که به طور مستقیم توسط آب جذب می شوند [۵].

تشدید پلاسمونی سطحی (SPR) تکنیک حسگری نوری با حساسیت بالا می باشد که برای آشکارسازی تغییرات کوچک ضریب شکست فصل مشترک فلز-دی الکتریک مورد استفاده قرار می گیرد. SPR به صورت گسترده ای برای نمایش در آن واحد برهم کنش های زیستی-مولکولی و آشکارسازی آنالیت های زیستی و شیمیایی در محیط مایع یا گاز مورد استفاده قرار می گیرد. این تکنیک به برهم کنش بین نور و الکترون های آزاد لایه فلز نجیب نیمه شفاف (یا تراشه) مبتنی است [۶].

در این مقاله، به بررسی تحریک لیزری سلول Herpg Hodode (سلول انتهای روده) که بر روی یک بستره نانوتوری دوبعدی کشت داده شده است پرداخته ایم که در واقع با باز و بسته شدن کانال های یونی موجود در سلول بر اثر تابش لیزر در فرکانس های مختلف و بازه زمانی ثابت، ضریب شکست محیط سلولی تغییر کرده و با تحلیل نتایج حاصل به تاثیر فرکانس در ساختار موردنظر پی برد.

درواقع در میان انواع مختلف منابع خارجی که برای تنظیم پتانسیل غشاء عصبی استفاده می شود، همیشه تحریک الکتریکی به دلیل قابلیت کنترل خوب و قابل اعتماد بودن بعنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته می شده است. با این حال، تحریک الکتریکی دارای محدودیت هایی نظیر دقت فضایی محدود به دلیل گسترش میدان الکتریکی ذاتی و تهاجم اجتناب ناپذیر برای تحویل بار، دارا نبودن ثبات مکانیکی، آسیب ناشی از کاشت و پاسخ التهابی پس از آن است [۱ و ۲]. بعلاوه، به طور مشابه دانشمندان علوم اعصاب از توانایی روشن یا خاموش کردن هر نورون بصورت مجزا باید استفاده کنند. لذا استراتژی های جایگزین مانند روش های مغناطیسی، مکانیکی و نوری [۳ و ۴] پیشنهاد شده است تا فعالیت های عصبی را در سیستم عصبی مرکزی و ثانویه (محیطی) مدوله کند. استفاده از نور در توانایی کنترل رفتار نورون ها و خاموش و روشن کردن آنها بسیار مورد علاقه قرار گرفته است چرا که تا حدودی نسبت به بقیه ی روش ها از تهاجم کمتری برخوردار است [۵]. تکنیک های تنظیم نورون ها با استفاده از نور، به دلیل رزولوشن فضایی و زمانی مزایای زیادی در بررسی مدار نورونی دارد.



شکل ۱: انواع روش های مختلف تحریک. (A).

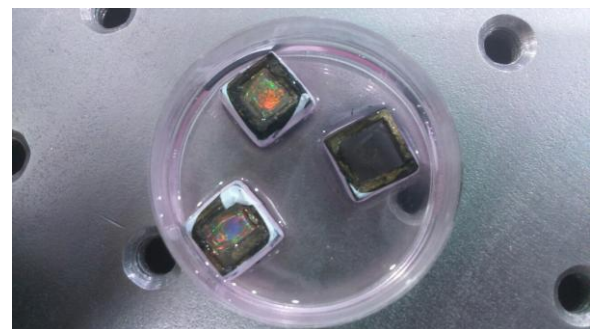
الکتریکی (B) نوری (C) تشدید مغناطیسی و (D) مولکولی.

۲-شرح آزمایش

۱-۲ آماده سازی نمونه ها

برای آماده سازی نمونه ها در ابتدا نانوتوری های دوبعدی از جنس PDMS را به روش لیتوگرافی چاپ نرم تهیه کرده و سپس از روش لایه نشانی گرمایی استفاده کردیم (شکل ۲).

بدین منظور، با استفاده از روش لایه نشانی گرمایی به ضخامت ۳۳ نانومتر طلا بر روی سطح طرح دار PDMS لایه نشانی شده است. در مرحله ی بعدی، روی ساختار نانوتوری های دو بعدی پلاسمونی کشت سلول Herpg Hodode انجام گرفته است که از ناحیه ی کلون روده ی موش جداسازی شده است. سلول های Hep G2 در RPMI 1640 شامل ده درصد FBS و دو درصد pen-strep کشت شده اند. سلول ها با استفاده از ۰.۲۵ درصد تریپسین و سانتریفیوژ کردن، تریپسی می شوند و پس از رسیدن به کانفلوئنسی ۷۰-۸۰ درصد پاساژ داده می شوند. پس از آسپیراسیون سلولی، سلول ها را مجدداً در محیط جدید غوطه ورمی کنیم و در ظروف جدیدی قرار می دهیم. برای پوشش نمونه ها، هر نمونه توسط UV ضد عفونی می شوند و به پلیتی با شش چاهک منتقل می شوند.

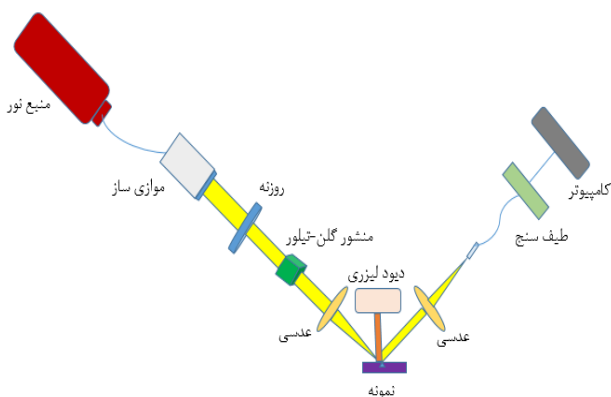


شکل ۲: کشت سلول بر روی بستره پلاسمونی دو بعدی

برای هر چاهک، سوسپانسیونی متشکل از سلول ها اضافه می شوند به گونه ای که نمونه ها با سلول ها پوشیده شوند. هر چاهک حداقل شامل صد هزار سلول می باشد. یک روز بعد نمونه ها قابل اندازه گیری می باشند.

۲-۲ روش طیف سنجی:

بیضی سنجی یک تکنیک اندازه گیری نوری مبتنی بر قطبش نور فرودی است. نتیجه ی اندازه گیری های بیضی سنجی دو پارامتر Ψ (سای) و Δ (دلتا) می باشد که زوایای اندازه گیری نامیده می شوند. این دو پارامتر اطلاعاتی راجع به عملکرد اپتیکی و ریخت شناسی ماده ی مورد بررسی شامل لایه های بالایی به ما می دهند. بیضی سنجی یک روش غیر مستقیم است که در آن مدل سازی ریاضیاتی اعمال می شود تا بتوان اطلاعاتی را مربوط به ساختار نمونه ی مورد بررسی به دست آورد. طیف سنجی از نمونه ها به ازای زاویه ی برخوردی ۴۰ درجه، تحت بازه ی زمانی ثابت ۵ میلی ثانیه و فرکانس های ۰، ۳، ۵ و ۷ هرتز، یک بار از نمونه ی بدون سلول و یک بار با سلول در محیط کشت DMEM به ازای قطبش های نور فرودی S و P با چیدمان شکل ۳ به عمل آمده است. پس از طیف سنجی، نمودار شدت بازتابی به ازای نمونه دارای سلول و بدون سلول رسم شده است.

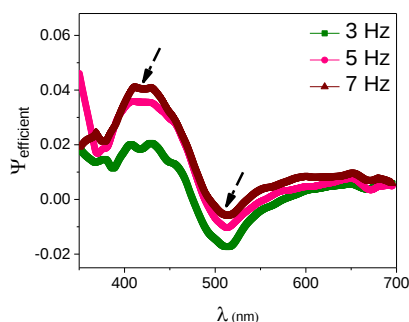


شکل ۳: چیدمان طیف سنجی بازتابی.

۳-بحث

نمودار سای موثر نمونه های طلا روی توری دو بعدی به ازای زاویه ی فرودی ۴۰ درجه و برای فرکانس های ۰، ۳، ۵ و ۷ در شکل ۴ رسم شده است. این مولفه برابر با تقسیم اختلاف مولفه سای در حالت هایی که سلول بر روی نمونه

است، ندارد و از طریق مدولاسیون زاویه و تغییرات شدت
میتوان پی به اندازه‌ی کیفی فعالیت نورونی سلول برد.



شکل ۴: نمودار Ψ موثر

مرجع‌ها

- [1]. Grill, W. M., Norman, S. E., & Bellamkonda, R. V. (2009). Implanted neural interfaces: biochallenges and engineered solutions. *Annual review of biomedical engineering*, 11, 1-24.
- [2]. Wells, J. D., Kao, C., Jansen, E. D., Konrad, P. E., & Mahadevan-Jansen, A. (2005). Application of infrared light for in vivo neural stimulation. *Journal of biomedical optics*, 10(6), 064003.
- [3]. Bonmassar, G., Lee, S. W., Freeman, D. K., Polasek, M., Fried, S. I., & Gale, J. T. (2012). Microscopic magnetic stimulation of neural tissue. *Nature communications*, 3, 921.
- [4]. Tufail, Y., Matyushov, A., Baldwin, N., Tauchmann, M. L., Georges, J., Yoshihiro, A. & Tyler, W. J. (2010). Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits. *Neuron*, 66(5), 681-694.
- [5]. Han, X., & Boyden, E. S. (2007). Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PloS one*, 2(3), e299.
- [6]. X. Han and E. S. Boyden, "Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution," *PLOS One* 2(3), e299 (2007).
- [7]. Long, Y. T., & Jing, C. (2014). Localized surface plasmon resonance based nanobiosensors (pp. 1-119). Springer Berlin Heidelberg

کشت نشده است و حالتی که سلول کشت شده است بر
مجموع این دو حالت است. به عبارتی دیگر:

$$(\Psi_{\text{efficient}})_{\text{frequency}} = \left(\frac{\Psi_{\text{withcell}} - \Psi_{\text{withoutcell}}}{\Psi_{\text{withcell}} - \Psi_{\text{withoutcell}}} \right)_{\text{frequency}}$$

پس از به‌دست آوردن مقدار مولفه‌ی سای موثر برای
فرکانس‌های متفاوت ۳، ۵ و ۷ (شکل ۴)، مشاهده
می‌شود قله‌ای در فرکانس ۴۲۵ نانومتر و دره‌ای در
فرکانس ۵۱۰ نانومتر ظاهر می‌شود. با تفریق مقادیر سای
موثر در قله و دره برای هر فرکانس، مقادیر ۰،۰۳۵۷،
۰،۰۴۵۹ و ۰،۰۴۶۱ به ترتیب برای فرکانس‌های ۳، ۵ و ۷
هرتز به دست می‌آید. به عبارتی دقیق‌تر، با افزایش
فرکانس شاهد افزایش اختلاف قله-دره در نمودار سای
موثر هستیم. فرکانس بالاتر می‌تواند نمایانگر میزان فعالیت
عصبی بیشتر سلول کشت شده باشد و این افزایش فعالیت
به خوبی در افزایش میزان اختلاف قله-دره با افزایش
فرکانس مشهود است.

۴- نتیجه گیری

با کشت سلول بر روی بستره‌ی پلاسمونیک و استفاده از
روش اندازه‌گیری بیضی‌سنجی، توانستیم حساسیت
سلول‌های کشت شده بر روی ساختار به فرکانس لیزر
مورد استفاده را با دیدگاهی نوین ارائه دهیم. برای تحریک
سلول می‌توان اطلاعاتی کیفی و کمی در مورد نوع سلول
و تحریک لیزری آن به‌دست آورد که کاربری‌هایی از جمله
تیمار فوتوگرمایی دارد. در ضمن، بایوحسگر پلاسمونیک
ساخته شده برخلاف بایوحسگرهای دیگر احتیاجی به
گیرنده‌های زیستی که یکی از مشکلات زیست‌شناسان