



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



طراحی و ساخت سیستم ثبت الکتروفیزیولوژی مبتنی بر اپتو الکترو د آرایه ای برای کاربردهای اپتوژنتیک برون تنی

پوریا قاسمی^۱، محمد اسماعیل زیبائی^{*۱}، سیده مهشاد حسینی^۱، محمد رضا صالحی مقدم^۱

^۱ پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی تهران

* m_zibaye@sbu.ac.ir

چکیده- در تکنیک اپتوژنتیک که به مطالعه و بررسی سیستم عصبی به کمک نور می پردازد، لازم است همزمان و یا بعد از تحریکات نوری با استفاده از روش های ثبت الکتروفیزیولوژی، عملکرد سلول مورد بررسی قرار گیرد. در این مقاله یک سیستم آرایه ای یکپارچه برای تحریک نوری و ثبت الکتروفیزیولوژی همزمان برای کاربردهای اپتوژنتیک طراحی و ساخته شده است. در این سیستم، آرایه میکروالکترونی ۴×۴ با الکترودهای دایره ای به شعاع ۱۵۰ میکرومتر از جنس طلا با امپدانس الکترودهای ۱۰۴ KΩ در فرکانس ۱ kHz ساخته شده است. برای تابش دهی از LED های با ابعاد ۵×۱، ۰،۳۵×۰،۵ میلی متر، طول موج ۴۷۳ نانومتر و حداکثر توان تابشی ۶۰ میلی وات استفاده شده است. عملکرد سیستم طراحی شده نیز با اندازه گیری سیگنال عصبی pc^{۱۲} و سلول های بنیادی قلبی، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

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

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

Pouria Ghasemi^۱, Mohammad Ismail Zibaii^{*۱}, Seyedeh Mahshad Hosseini^۱, Mohammad Reza Salehi Moghadam^۱

^۱ Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran

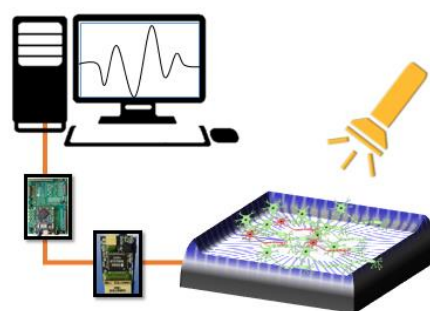
*m_zibaye@sbu.ac.ir

Abstract- In the optogenetic technique, which studies the neural system with light, it is necessary to examine cell function at the same time or after light stimulation using electrophysiological recording methods. In this paper, an integrated array optrode system for optical stimulation and electrophysiology recording is designed and fabricated for optogenetic applications. In this system using micromachining and photolithography a ۴ × ۴ microelectrode array was fabricated with circular diameter ۳۰۰ μm from and impedance ۱۰۴ KΩ at ۱ kHz. In this design, LEDs with dimensions of ۱ × ۰،۵ × ۰،۳۵ mm, wavelength of ۴۷۳ nm and a maximum radiant power of ۶۰ mW have been used for irradiation. The performance of the designed system has also been evaluated by measuring the pc^{۱۲} nerve signal and cardiac stem cells.

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

مقدمه

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



شکل ۱: نمایی از ترکیب روش اپتوژنتیک با ثبت الکتروفیزیولوژی توسط آرایه اپترودی

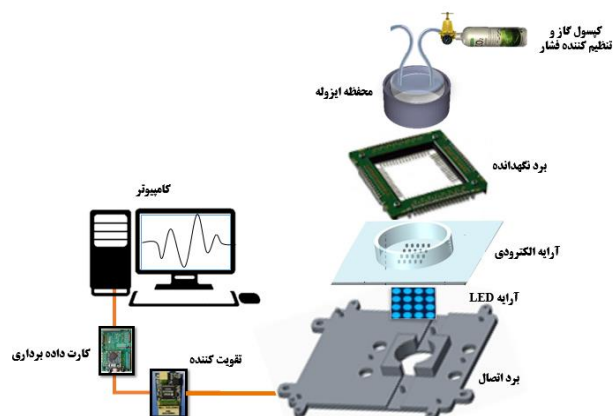
یکی از روش‌های ثبت الکتروفیزیولوژی استفاده از آرایه‌های میکروالکترودی است. یک سیستم آرایه چند الکترودی (MEA) معمولاً به عنوان یک ابزار ثبت غیر تهاجمی و برای مطالعه سلول‌ها و بافت‌های تحریک‌پذیر، مانند نورون‌های محیطی و بافت مغز و قلب استفاده می‌شود.

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

در این مقاله طراحی و ساخت یک سیستم ثبت الکتروفیزیولوژی برون‌تنی مبتنی بر آرایه میکروالکترودی 4×4 دوبعدی و زیست‌سازگار به صورت یکپارچه شده با سیستم نوری گزارش می‌شود. به طور کلی این ساختار باعث می‌شود که هزینه‌ها، زمان ساخت و تعداد مراحل کاهش یابد و نیز از پیچیدگی کمتری نسبت به میکروالکترودهای مرسوم برخوردار باشد. برای اینکه بتوان هر سلول را به صورت جداگانه مورد تحریک قرار داد، از تراشه LED که دارای ابعادی متناسب با تراشه آرایه میکروالکترودی است، استفاده شده است.

طراحی و ساخت

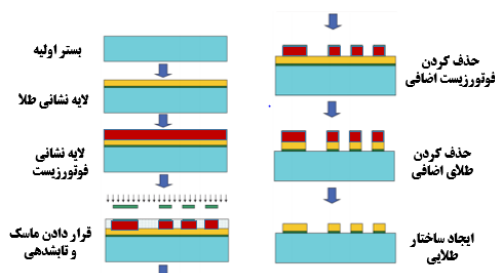
سیستم الکتروفیزیولوژی پیشنهادی مطابق شماتیک شکل (۲) شامل دو قسمت ساخت سیستم تابش‌دهی و ساخت آرایه‌های میکروالکترودی می‌باشد. که این دو قسمت به صورت یکپارچه به یکدیگر متصل می‌شوند.



شکل ۲: شماتیک کل ساختار

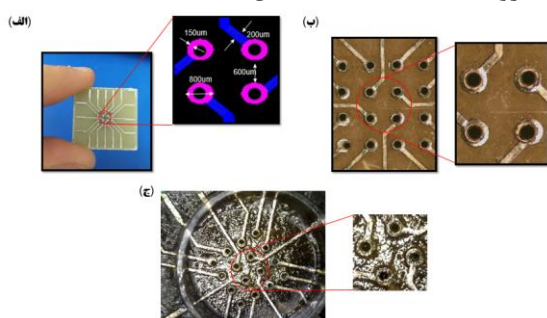
برای تابش دهی در این طراحی یک آرایه LED 4×4 سایت تحریک نوری، در طول موج 473 نانومتر، بیشینه توان 60 میلی وات، بیشترین جریان ورودی 20 میلی آمپر، ولتاژ ورودی 5 ولت و ابعاد $1/5 \times 0/35 \times 0/35$ میلی متر ساخته شده است. در این آرایه فاصله مرکز تا مرکز هر دو LED از هم 800 میکرومتر می‌باشد. همچنین میزان شدت و فرکانس تابشی توسط هر کدام از LEDها، توسط کد نوشته شده در

ساختار با فوتورزیست عایق شده و پدهای الکترونی فاقد روکش فوتورزیست می‌باشد.



شکل ۴: مراحل تکنیک لیتوگرافی

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

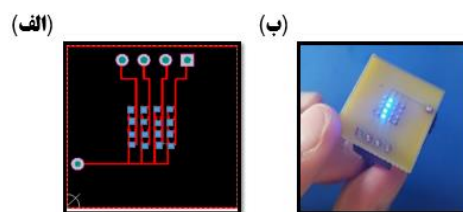


شکل ۵: (الف) بستر و ابعاد الکترودهای ثبت (ب) نمای الکترودها بعد از لایه نشانی (ج) نمای الکترودها بعد از لیتوگرافی

چیدمان آزمایش برای ثبت الکتروفیزیولوژی

بعد از آماده سازی تراشه الکترونی و سیستم تابشدهی، برای انجام ثبت الکتروفیزیولوژی از چیدمان شکل (۶) استفاده شده است که شامل الکترودهای آرایه‌ای، برد اتصال الکترودهای آرایه‌ای، تقویت کننده و کارت داده برداری می‌باشد. ثبت از سلول‌های عصبی PC₁₂ و قلبی بعد از اندازه‌گیری امپدانس الکترودها، صورت گرفته است. برای این منظور طبق استانداردهای کاشت سلول در مدت ۲۴ ساعت سلول‌های هدف بر روی الکتوردها کاشته می‌شود تا برای ثبت سیگنال آماده شوند [۱]. بطور مثال در ثبت سیگنال از سلول PC₁₂، ابتدا رده سلولی PC₁₂ در محیط کشت کامل که حاوی DMEM-High glucose بود، همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۰٪ سرم اسبی و ۲ میلی مولار گلوتامین و ۱٪ آنتی بیوتیک- آنتی مایکوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، O₂ ۲۰٪ و CO₂ ۵٪ کشت داده شدند. پس از

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



شکل ۳: (الف) تصویر شماتیک (ب) تصویر آرایه LED ساخته شده

ساخت آرایه میکروالکترونی

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

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

مهم مورد بررسی، تعداد نبض‌ها در واحد زمان می‌باشد. در این مقاله تعداد ۲ نبض در هر ثانیه بدست آمده است که مطابق با نتایج گزارش شده قبلی می‌باشد [۲]. همچنین با تطابق شکلی سیگنال‌های عصبی بدست آمده با سیگنال‌های دریافت شده از سلول‌های PC_{12} در مقالات مشابه [۱] در بازه ۴۰۰- تا ۴۰۰ ولت، می‌توان نتیجه گرفت که سیستم ساخته شده دارای الکترودها و سیستم تابش‌دهی مناسب برای ثبت الکتروفیزیولوژی در کاربردهای اپتوزنتیک می‌باشد.

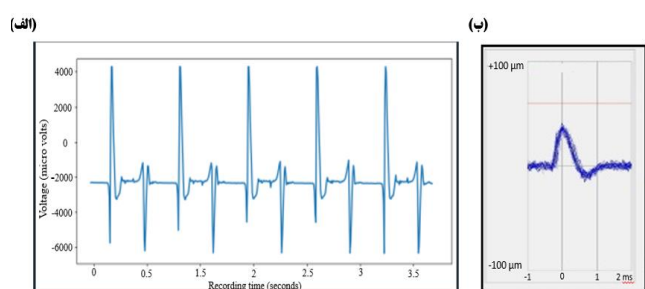
پاساژ، سلول‌ها درون تراشه‌های الکترودی کاشته شدند و توسط اجزا شکل (۶) از آن‌ها ثبت گرفته شد.



شکل ۶: اجزا سیستم ثبت الکتروفیزیولوژی

نتایج و جمع‌بندی

در این طراحی مقدار امپدانس الکترودها قبل و بعد از لایه نشانی طلا اندازه‌گیری و مقادیر ۳۴۰، ۲۱۰، ۱۰۳ و ۹۳ کیلو اهم به ترتیب در فرکانس‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ هرتز اندازه‌گیری شده است. سپس ثبت الکتروفیزیولوژی از سلول‌های عصبی PC_{12} و سلول‌های قلبی (hPSC-derived cardiomyocytes) انجام شده است. در شکل (۷) تصویر یک نمونه از سلول‌های کشت داده شده بر روی یک الکترود نشان داده شده است. با توجه به اینکه مجموعه سلولی که بر روی هر الکترود قرار گرفته ثبت انجام می‌شود، از دیدگاه الکتروفیزیولوژی سیگنال ثبت شده از نوع ثبت میدانی می‌باشد که در بازه فرکانسی ۱۰۰-۳۰۰ Hz قرار دارد. پس از ثبت سیگنال با اعمال فیلترهای فرکانسی در این بازه فرکانسی سیگنال‌های مطابق شکل (۸) بدست می‌آید.

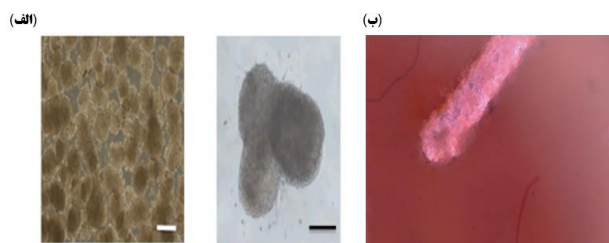


شکل ۸: الف) سیگنال دریافتی از سلول‌های قلبی ب) سیگنال دریافتی از سلول عصبی PC_{12}

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

مرجع‌ها

- [۱] Garma, L. D., Matino, L., Melle, G., Moia, F., De Angelis, F., Santoro, F., & Dipalo, M. (۲۰۱۹). Cost-effective and multifunctional acquisition system for in vitro electrophysiological investigations with multi-electrode arrays. *PloS one*, 14(۳), e۰۲۱۴۰۱۷.
- [۲] Salazar, B. H., Hoffman, K. A., Reddy, A. K., Madala, S., & Birla, R. K. (۲۰۱۸). ۱۶-Channel Flexible System to Measure Electrophysiological Properties of Bioengineered Hearts. *Cardiovascular engineering and technology*, 9(۱), ۹۴-۱۰۴.



شکل ۷: الف) سلول‌های قلبی انسانی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی (hPSC-derived cardiomyocytes) ب) سلول‌های عصبی PC_{12}

شکل سیگنال‌های سلول‌های قلبی با توجه به رفتار سلول و طول عمر سلول در زمان‌های مختلف متفاوت است و پارامتر

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

- [۳] Yang, W., Gong, Y., & Li, W. (۲۰۲۰). A Review: Electrode and Packaging Materials for Neurophysiology Recording Implants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, ۱۰۱۵.