

Rozprawa Doktorska

mgr. inż. Elżbieta Jarosińska

**Opracowanie elektrochemicznych macierzy czujnikowych
do monitorowania hodowli komórkowych**

Promotor:

Prof. dr hab. Anders Martin Jönsson-Niedziółka

Promotor pomocniczy:

dr inż. Emilia Witkowska-Nery

Rozprawa doktorska realizowana w ramach Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk
Ścisłych i BioMedycznych Warsaw-4-PhD w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej
Akademii Nauk ul. Kasprzaka 44/52, 01-224, Warszawa, Polska.

Warszawa 2025

Podziękowania

First and foremost I would like to thank my supervisors:

Prof. Martin Jönsson-Niedziółka & Dr inż. Emilia Witkowska-Nery

for support and all shared knowledge for my years in the Institute, for support and valuable comments during the preparation of my doctoral thesis, for giving scientific freedom, for guidance and all the incentive to travel abroad to gain scientific experience

I would also like thank:

Dr Antonina Lavrentieva

for the opportunity of my Erasmus internship in Hannover, Germany, for scientific guidance and shared knowledge about 3D cell culture

Dr Cecilia de Carvalho Castro e Silva

for the opportunity of my NAWA STER internship in São Paulo, Brazil

Dr Karina Kwapiszewska

for the opportunity of work in cell culture lab, for all scientific guidance and shared knowledge about cell culture

I am very grateful for all help, support and shared cups of tea and talks in the corridor during my time in the Institute from: Dr Magdalena Wiloch, Dr Marcin Filipiak, Dr Karthika Kappalakandy Valapil and all current and former members of Charge Transfer Processes in Hydrodynamic Systems Group, Sensor Arrays Group and IPC PAN coworkers.

Podziękowania kieruję również do moich przyjaciół, koleżanek i kolegów z Rady Samorządu Doktorantów PAN oraz Chóru SGGW. Bez was ta droga byłaby dużo trudniejsza.

Chciałabym również podziękować moim rodzicom oraz siostrze, za zrozumienie, cierpliwość oraz ogromne wsparcie przez ostatnie lata.

Pamięci mojego dziadka

Dorobek naukowy:

Publikacje, których wyniki są przedstawione w rozprawie doktorskiej:

1. Jarosińska E, Zambrowska Z, Witkowska Nery E. Methods of Protection of Electrochemical Sensors against Biofouling in Cell Culture Applications. *ACS Omega*, **2024**, 9, 4, 4572–4580

Publikacje, których tematyka jest powiązana z rozprawą doktorską:

2. Valapil KK, Marcin Szymon Filipiak MS, Rekiel W, Jarosińska E, Nogala W, Jönsson-Niedziółka M, Witkowska-Nery E, Fabrication of ITO microelectrodes and electrode arrays using a low-cost CO₂ laser plotter. *Lab Chip*, **2023**, 23, 3802-3810
3. Gabler T, Valapil KK, Jarosińska E, Krześniak A, Janik M, Koba M, Witkowska-Nery E, Jönsson-Niedziółka M, Śmietana M, Microcavity in-line Mach-Zehnder interferometer and electrochemical assays combined for cell monitoring system. Proceedings Volume 12643, European Workshop on Optical Fibre Sensors (EWOFS **2023**); 1264312 (2023)

Pozostałe publikacje:

4. Jarosińska E, Wojnowska J, Martyna Durka M, Podrażka M, Witkowska-Nery E, Low-cost, syringe based ion-selective electrodes for the evaluation of potassium in food products and pharmaceuticals. *Electrochimica Acta*. **2024**, 508, 145209
5. Valapil KK, Jarosińska E, Filipiak MS, Mazurkiewicz W, Witkowska-Nery E., Guidelines on the development of sensors and application of data analysis tools for potentiometric electronic tongues. **2021**
6. Mazurkiewicz W, Podrażka M, Jarosińska E, Valapil KK, Wiloch M, Jönsson-Niedziółka M, Witkowska-Nery E, Paper-based electrochemical sensors and how to make them (work). *ChemElectroChem* **2020**, 7, 2939 – 2956

Streszczenie

Opracowanie metod hodowli komórkowej *in vitro* stanowi jedno z najważniejszych osiągnięć biologii eksperymentalnej poprzedniego stulecia. Pozwala ona na wyizolowanie komórek z tkanek oraz ich hodowlę w warunkach fizjologicznych poza organizmem macierzystym. Dotychczas prowadzone badania z wykorzystaniem hodowli komórkowych pozwoliły na poznanie wielu mechanizmów komórkowych, a także przyczyniły się do testowania nowych leków oraz opracowaniu szczepionek. Powszechnie stosowane metody hodowli komórkowej stosowane w badaniach biomedycznych nie odzwierciedlają warunków *in vivo*, jednak umożliwiają uzyskanie powtarzalnych wyników przy relatywnie niskim koszcie.

Obecnie jednym z największych wyzwań jest opracowanie trójwymiarowego (3D) modelu hodowli komórkowej, który pozwoli na dokładniejsze odwzorowanie warunków fizjologicznych *in vivo*. Analiza hodowli komórkowych opiera się przede wszystkim na metodach optycznych, analizie mikroskopowej morfologii komórek, ich barwieniu i testach punktu końcowego. Ważnym aspektem jest możliwość wykorzystania czujników pozwalających m.in. na pomiar zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych podczas całej hodowli. W ostatnich latach wzrasta wykorzystanie metod elektrochemicznych w analizie hodowli komórkowej, ze względu na możliwość miniaturyzacji oraz integracji czujników elektrochemicznych w układach mikroprzepływowych.

W niniejszej pracy doktorskiej została podjęta tematyka wykorzystania elektrochemicznych czujników tlenu, glukozy oraz pomiarów impedancji w analizie parametrów metabolicznych w statycznych hodowlach komórkowych. Dodatkowym zagadnieniem był temat warstw przeciwpoporostowych, które umożliwiają długoterminowe badania w hodowlach komórkowych przy zachowaniu stabilności sygnału.

W pierwszym etapie pracy zidentyfikowano katalizator reakcji redukcji tlenu umożliwiający pomiar przy niskim nadpotencjale na różnych rodzajach elektrod, w tym elektrod złotych wytworzonych w procesie napyłania prowadzonym w wysokiej próżni oraz elektrod wytworzonych metodą druku 3D. Elektrody złote w opracowanej matrycy 8-elektrodowej charakteryzowały się czułością na poziomie $76,8 \pm 6,5 \text{ nA}/\%$ w zakresie niskich stężeń ($2 - 18 \text{ \% O}_2$).

Równolegle zidentyfikowano warstwę przeciwpoporostową umożliwiającą długoterminowe pomiary w hodowlach komórkowych z wykorzystaniem elektrod węglowych. Prowadzono pomiary w pożywce hodowlanej z wykorzystaniem ponad

11 różnych związków o właściwościach przeciwpromienniczych, a jako modelową warstwę katalizatora wykorzystano syrynglądazynę wykazującą charakterystyczną liniową zależność maksimum piku redukcji/utlenienia w zależności od pH roztworu oraz stabilność w roztworach buforowych. Prowadzone pomiary techniką woltamperometrii cyklicznej oraz woltamperometrii pulsów różnicowych wykazały, że modyfikacja na bazie krzemianu jest najbardziej skutecznym materiałem przeciwpromienniczym dla elektrod węglowych w hodowli komórkowej. Sygnał badanej warstwy wskaźnikowej był widoczny przez cały czas trwania eksperymentu, a test AlamarBlue i analiza mikroskopowa nie wykazała znaczących efektów toksycznych dla linii komórkowej HeLa.

W drugim etapie pracy prowadzono badania z wykorzystaniem opracowanej matrycy 8-elektrod złotych wytworzonych w procesie napyłania prowadzonego w wysokiej próżni. W hodowli komórek linii HepG2 analizowano zmiany stężenia tlenu i glukozy, a także impedancji podczas inkubacji z roztworem DMSO oraz acetaminofenonu. Wyniki testu AlamarBlue po inkubacji z acetaminofenonem wykazały znacznie obniżoną żywotność komórek linii HepG2 w porównaniu do testu z wykorzystaniem płytki 96-dółkowej.

W trzecim etapie pracy opracowaną macierz elektrod wykorzystano w pomiarach w trójwymiarowej hodowli komórek linii huChO oraz HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych w warunkach statycznych. Do enkapsulacji komórek wykorzystano półsyntetyczny hydrożel GelMa. Przeprowadzono analizę zmiany tlenu oraz impedancji w hodowli 3D w obniżonych warunkach stężenia tlenu (5% O₂) oraz podczas inkubacji z roztworem acetaminofenonu. Ze względu na znaczną średnicę wykorzystywanego układu pomiarowego oraz średnicę matrycy hydrożelowej, obserwowano rozpuszczenie matrycy hydrożelu podczas 72h hodowli. W pracy wskazano potrzebne zmiany w architekturze wykorzystywanego układu pomiarowego, które w przyszłości pozwolą na dokładniejszą analizę parametrów metabolicznych metodami elektrochemicznymi.

Słowa kluczowe: elektrochemiczne czujniki tlenu, macierze czujnikowe, warstwy przeciwpromiennicze, HepG2, hodowle komórkowe 3D

Abstract

The development of *in vitro* cell culture methods is one of the most important achievements of experimental biology in the last century. It allows cells to be isolated from tissues and cultured under physiological conditions outside the parent organism. Research conducted to date using cell cultures has led to the discovery of many cellular mechanisms and has contributed to the testing of new drugs and the development of many vaccines. Commonly used cell culture methods in biomedical research do not reflect *in vivo* conditions, but they do allow for reproducible results at a relatively low cost.

Currently, one of the biggest challenges is to develop a three-dimensional (3D) cell culture model that will allow for a more accurate representation of physiological conditions *in vivo*. The analysis of cell cultures is primarily based on optical methods, microscopic analysis of cell morphology, staining, and endpoint tests. An important aspect is the possibility of using sensors that allow, among other things, the measurement of extracellular signalling molecules throughout the entire culture. In recent years, the use of electrochemical methods in cell culture analysis has been increasing due to the possibility of miniaturization and integration of electrochemical sensors in microfluidic systems.

This dissertation concerns the use of electrochemical oxygen sensors in the analysis of metabolic parameters in static cell cultures. An additional topic was anti-fouling coatings, which enable long-term research in cell cultures while maintaining signal stability.

In the first stage of the work, an oxygen reduction reaction catalyst was identified that enabled measurement at low overpotential on various types of electrodes, including sputtered gold electrodes and 3D printing electrodes. The gold electrodes in the developed 8-electrode sensor array were characterized by a sensitivity of $76.8 \pm 6.5 \text{ nA/\%}$ in the low concentration range (2-18% O₂).

At the same time, an anti-fouling layer was identified that enabled long-term measurements in cell cultures using carbon electrodes. Measurements were carried out in culture medium using more than 11 different compounds with anti-fouling properties. Syringladazine was used as a model catalyst layer, exhibiting a characteristic linear dependence of the reduction/oxidation peak potential on the pH of the solution and stability in buffer solutions. Measurements using cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry showed that silicate-based modification is the most effective anti-fouling material for carbon electrodes in cell

culture. The signal of the tested indicator layer was visible throughout the experiment, and AlamarBlue tests and microscopic analysis showed no significant toxic effects on the HeLa cell line.

In the second stage of the work, experiments were conducted using a developed sensor array of 8 sputtered gold electrodes. In HepG2 cell culture, changes in oxygen and glucose concentrations and impedance were analyzed during incubation with DMSO and acetaminophenone. The results of the AlamarBlue test after incubation with acetaminophen showed significantly reduced viability of HepG2 cells compared to the test using a 96-well plate.

In the third stage of the work, the developed sensor arrays were used in measurements in a three-dimensional culture of huCho and HepG2 cells on hydrogel scaffolds under static conditions. A half-synthetic GelMa hydrogel was used for cell encapsulation. An analysis of oxygen change in 3D culture was performed under reduced oxygen conditions (5% O₂) and during incubation with acetaminophenone. Due to the large diameter of the measurement system used and the diameter of the hydrogel matrix, dissolution of the hydrogel matrix was observed during 72 hours of culture. The study indicated necessary changes in the architecture of the measurement system used, which will allow for more accurate analysis of metabolic parameters using electrochemical methods in the future.

Keywords: electrochemical oxygen sensors, sensor arrays, antifouling layers, HepG2, 3D cell cultures

Wykaz używanych skrótów:

- 2D – dwuwymiarowy (*ang. two-dimensional*)
- 3D – trójwymiarowy (*ang. three-dimensional*)
- 3R – zasada (*ang. Replacement, Reduction, Refinement*)
- ADME – wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie (*ang. adsorption, distribution, metabolism, excretion*)
- ATCC – amerykańska kolekcja hodowli komórkowych (*ang. American Type Culture Collection*)
- BSA – albumina surowicy bydlęcej (*ang. Bovine serum albumine*)
- CAD – projektowanie wspomagane komputerowo (*ang. Computer Aided Design*)
- CE – przeciwelektroda (*ang. counter electrode*)
- CoTMPP – 5,10,15,20-Tetrakis(4-metoksyfenylo)-21H,23H-porfina kobaltu(II) (*ang. 5,10,15,20-Tetrakis(4-methoxyphenyl)-21H,23H-cobalt(II) porphyrin*)
- CoTPP – 5,10,15,20-Tetrafenylo-21H,23H- porfina kobaltu(II) (*ang. 5,10,15,20-Tetrapheny-21H,23H-cobalt(II) porphyrin*)
- CTB – Test żywotności komórek CellTiter-Blue® (*ang. CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*)
- CV – woltamperometria cykliczna (*ang. Cyclic Voltammetry*)
- DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (*ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole*)
- DCM – dichlorometan (*ang. dichloromethane*)
- DMEM – podstawowe medium do hodowli komórek (*ang. duplecco essential medium eagle*)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy, (*ang. deoxyribonucleic acid*)
- DoF – stopień funkcjonalizacji (*ang. degree of functionalization*)
- DPV – woltamperometria różnicowa impulsowa (*ang. Differential Pulse Voltammetry*)
- ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (*ang. extracellular matrix*)
- EFPIA – Europejska Federacja Przemysłu Farmaceutycznego i Stowarzyszeń (*ang. The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*)
- EIS – elektrochemiczna impedancja spektroskopowa (*ang. Electrochemical impedance spectroscopy*)
- EMA – Europejska Agencja Medyczna (*ang. European Medical Agency*)
- ESCs – komórki macierzyste (*ang. Embryonic stem cells*)
- EURL ECVAM – Laboratorium referencyjne UE ds. alternatyw dla badań na zwierzętach (*ang. EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing*).
- FA – FiloAlfa

- FBS – płodowa surowica bydlęca (*ang. fetal bovine serum*)
- FDA – amerykańska agencja Żywności i Leków (*ang. US Food and Drug Administration*)
- FeTMPPCl – chlorek 5,10,15,20-Tetrakis(4-metoksyfenylo)-21H,23H-porfiryny żelaza(III) (*ang. 5,10,15,20-Tetrakis(4-methoxyphenyl)-21H,23H-porphyrin iron(III) chloride*)
- FRET – rezonansowy transfer energii Förstera (*ang. Förster Resonance Energy Transfer*)
- GCE – elektrody z węgla szklстого (*ang. glassy carbon electrode*)
- GDH – dehydrogenaza glukozowa (*ang. glucose-1-dehydrogenase*)
- GelMa – metakrylan żelatyny (*ang. gelatin methacryloyl*)
- GFP – zielone fluorescencyjne białko (*ang. green fluorescent protein*)
- hAD-MSC – ludzkie komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (*ang. human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*)
- HEMA – metakrylan hydroksyetylu (*ang. hydroxyethyl methacrylate*)
- HEPES – kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy (*ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)
- HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (*ang. hepatocyte growth factor*)
- HTS – badanie przesiewowe o wysokiej przepustowości (*ang. High-throughput screening*)
- iPSC – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*ang. induced pluripotent stem cells*)
- ITF – Grupa Zadaniowa ds. Innowacji (*ang. Innovation Task Force*)
- ITO – elektrody na bazie ITO (*ang. Indium tin oxide*)
- LAP – Fosfinian litu i 2,4,6-trimetylobenzoilu (*ang. Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat*)
- LIG – elektrody indukowane laserowo (*ang. Laser-Induced Graphene electrodes*)
- LPE – elektrody z grafitu ołówkowego (*ang. lead pencil electrode*)
- MA – żelatyna metakryloilowa (*ang. methacrylic anhydride*)
- MnTPPCL - chlorek 5,10,15,20-Tetrafenylo-21H,23H-porfiryny manganu(III) (*ang. 5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-manganese(III) porphyrin chloride*)
- mRNA – matrycowy RNA (*ang. messenger RNA*)
- MSC – mezenchymalne komórki macierzyste (*ang. Mesenchyma stem cells*)
- NAM – nowe metodologie (*ang. New Approach Methodologies*)
- OPD – o-fenylendiamina (*ang. o-phenylenediamine*)
- ORR – reakcja redukcji tlenu (*ang. oxygen reduction reaction*)
- PANI – polianilina (*ang. polyanilin*)

- PBS – buforowana fosforanami sól fizjologiczna (*ang. Phosphate-Buffered Saline*)
- PCL – poli(ϵ -kaprolakton) (*ang. poly(ϵ -caprolactone)*)
- PDGF – płytkowy czynnik wzrostu (*ang. platelet derived growth factor*),
- PDLA – kwas poli-D-mlekowy (*ang. poly-D-lactic acid*)
- PDMS – poli(dimetylosiloksan) (*ang. polydimethylsiloxane*)
- PEDOT – poli(3,4-etylenodioksytiofen) (*ang. poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*)
- PEG – glikol polietylenowy (*ang. polyethylene glycol*)
- PEGDE – eter diglicydylowy poli(glikolu etylenowego) (*ang. Poly(Ethylene Glycol) Diglycidyl Ether*)
- PEO – polioksyetylen (*ang. polyoxyethylene*)
- PLLA – kwas poli-L-mlekowy (*ang. poly-L-lactic acid*)
- PLL-PEG – poli(L-lizyna)-g-poli(etyleno glikol) (*ang. poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol)*)
- PM – Print-me
- poliHEMA - poli(2-hidroksyetylmetakrylat) (*ang. poly(2-hydroxyethyl methacrylate)*)
- PP – Proto-Pasta
- PPy – polipirol (*ang. polypyrrole*)
- PTh – politiofen (*ang. polythophene*)
- PVA – poli(alkohol winylowy) (*ang. poly(vinyl alcohol)*)
- PVC – poli(chlorek winylu) (*ang. poly(vinylchloride)*)
- PVP – poli(4-winylopirydyna) (*ang. poly(4-vinylpyridine)*)
- RE – elektroda odniesienia (*ang. reference electrode*)
- RNA - kwasy rybonukleinowe (*ang. ribonucleic acid*)
- SPE – elektrody drukowane metodą sitodruku (*ang. screen printed electrode*)
- SWV – woltamperometria prostokątna (*ang. Square Wave Voltammetry*)
- TERT – odwrotna transkryptaza telomerazy (*ang. telomerase reverse transcriptase*)
- TGF-b – transformujący czynnik wzrostu-b (*ang. transforming growth factor -beta*),
- TMA – chlorek trimetoksysilopropylu-N,N,N-trimetyloamoniowy, (*ang. trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammonium chloride*)
- TMOS – tetrametoksysilan (*ang. tetramethoxysilane*)
- VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor*),
- WE – elektroda pracująca (*ang. working electrode*)

Spis Treści

Wstęp	15
1. Wykorzystanie hodowli komórkowych w badaniach naukowych	19
1.1. Wprowadzenie	19
1.2. Porównanie hodowli dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych in vitro	21
1.3. Metody otrzymywania trójwymiarowych hodowli komórkowych	25
1.3.1. Metody oparte na naturalnych właściwościach komórek do agregacji – sferoidy	26
1.3.2. Metody oparte na rusztowaniach	28
1.4. Regulacje prawne dotyczące trójwymiarowych hodowli komórkowych	32
1.5. Metody oceny procesów biologicznych na poziomie komórkowym w hodowli komórkowej	35
1.5.1. Metody oceny procesów biologicznych na poziomie komórkowym w hodowli komórkowej	35
1.5.2. Wykorzystanie czujników w ocenie aktywności metabolicznej komórek w hodowlach komórkowych	37
1.5.3. Metody optyczne w ocenie aktywności metabolicznej komórek	38
1.5.4. Metody elektrochemiczne w ocenie aktywności metabolicznej komórek	39
1.6. Literatura	53
2. Opracowanie macierzy elektrodowej do hodowli komórkowej	62
2.1. Wprowadzenie	62
2.2. Materiały i metody	67
2.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny	67
2.2.2. Materiały	67
2.2.3. Odczynniki	67
2.3. Metody badań	68
2.3.1. Pomiary elektrochemiczne	68
2.3.2. Przygotowanie elektrod	68
2.3.3. Proces napylania elektrod	69
2.3.4. Proces wytworzenia elektrod ITO-Au	70
2.3.5. Proces wytworzenia elektrod LIG	71
2.4. Wyniki i dyskusja	71
2.4.1. Dobór katalizatora redukcji tlenu w niskim nadpotencjale	71
2.4.2. Ocena możliwości wykorzystania elektrod w pomiarze metabolizmu w hodowlach komórkowych	75
2.5. Wnioski	85
2.6. Literatura	86
3. Warstwy przeciwpoporostowe w analizie elektrochemicznej w hodowli komórkowej	89
3.1. Wprowadzenie	89
3.2. Materiały i metody	93

3.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny	93
3.2.2. Materiały	93
3.2.3. Odczynniki	94
3.3. Metody badań	94
3.3.1. Pomiary elektrochemiczne	94
3.3.2. Przygotowanie elektrod	95
3.3.3. Modyfikacja elektrod	96
3.3.4. Hodowla komórkowa	97
3.3.5. Metody oceny proliferacji i żywotności komórek	98
3.3.6. Układ pomiarowy	98
3.4. Wyniki i dyskusja	99
3.4.1. Wybór elektrod	100
3.4.2. Ocena stabilności wybranych warstw przeciwporostowych	102
3.4.3. Ocena wpływu środowiska hodowli komórkowej na stabilność warstw przeciwporostowych	108
3.5. Wnioski	112
3.6. Literatura	113
4. Ocena możliwości wykorzystania opracowanej macierzy elektrodowej do monitorowania hodowli komórkowych	117
4.1. Wprowadzenie	117
4.2. Materiały i metody	120
4.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny	120
4.2.2. Materiały	120
4.2.3. Odczynniki	121
4.3. Metody badań	121
4.3.1. Pomiary elektrochemiczne	121
4.3.2. Układ pomiarowy	121
4.3.3. Przygotowanie elektrod	122
4.3.4. Pomiary optyczne	124
4.3.5. Przygotowanie układu do badań	124
4.3.6. Hodowla komórkowa	124
4.3.7. Metody oceny proliferacji i żywotności komórek	125
4.4. Wyniki i dyskusja	126
4.4.1. Możliwość wykorzystania elektrod złotych do monitorowania parametrów metabolicznych komórek w pożywce hodowlanej	126
4.4.2. Monitorowanie parametrów metabolicznych metodą elektrochemiczną w hodowli komórkowej HepG2	132
4.5. Wnioski	150
4.6. Literatura	151
5. Ocena możliwości wykorzystania opracowanej macierzy elektrodowej do monitorowania trójwymiarowych hodowli komórkowych	155
5.1. Wprowadzenie	155
5.2. Materiały i metody	156
5.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny	156

5.2.2. Materiały	157
5.2.3. Odczynniki	157
5.3. Metody badań	158
5.3.1. Pomiary elektrochemiczne	158
5.3.2. Układ pomiarowy	158
5.3.3. Przygotowanie elektrod	158
5.3.4. Przygotowanie układu do badań	159
5.3.5. Hodowla komórkowa	159
5.3.6. Przygotowanie matrycy hydrożelowej	160
5.3.7. Hodowla komórek na rusztowaniach hydrożelowych	161
5.3.8. Metody oceny proliferacji i żywotności komórek	162
5.4. Wyniki i dyskusja	163
5.4.1. Wykorzystanie czujników optycznych w pomiarach stężenia tlenu w trójwymiarowych hodowlach komórkowych	163
5.4.2. Ocena proliferacji komórek HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa	167
5.4.3. Ocena wpływu acetaminofenu na komórki HepG2 w hodowli 2D i 3D	168
5.4.4. Monitorowanie parametrów metabolicznych metodą elektrochemiczną w trójwymiarowej hodowli komórkowej komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa	172
5.5. Podsumowanie i wnioski	184
5.6. Literatura	185
6. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań	187
Spis Rysunków	190
Spis Tabel	200

Wstęp

Proces opracowania oraz wprowadzenia nowych leków na rynek jest długi i niezwykle kosztowny. Trwa on około od 7 do 15 lat, a koszty przekraczają 1 mld euro. Pierwsze etapy obejmują badania podstawowe (w tym identyfikację cząsteczki o potencjale leczniczym), badania przedkliniczne *in vitro* (z wykorzystaniem dwuwymiarowych hodowli komórkowych), badania *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt. Kolejnym krokiem jest ocena aktywności i bezpieczeństwa leku u ludzi w badaniach klinicznych od I do III fazy. W badaniach klinicznych oceniane są bezpieczeństwo i tolerancja leku, ustalana jest optymalna dawka (faza I/II), oraz ocenie jest poddawana skuteczność leku dla danego wskazania. W fazie III prowadzone są badania porównawcze celem potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa leku na dużej grupie pacjentów w porównaniu do standardowych terapii. Po wprowadzeniu leku na rynek prowadzony jest dodatkowo proces monitorowania leku pod względem bezpieczeństwa, skuteczności oraz działań niepożądanych w długoterminowym stosowaniu.

Aż 30% leków jest odrzucana na etapie badań klinicznych, ze względu na niedokładne odwzorowanie tkanek i narządów *in vivo* w dwuwymiarowym modelu komórkowym oraz w modelu zwierzęcym. Z tego względu, opracowuje się trójwymiarowe hodowle komórkowe, które zapewniają lepsze zrozumienie złożonych interakcji między komórkami oraz dużo lepiej odwzorowują warunki *in vivo*. W przeciwieństwie do prostych hodowli dwuwymiarowych, umożliwiają one wzrost komórek w prawidłowym kierunku o określonej polarności, a także wydzielanie cząsteczek sygnałowych i określonych białek w normalnych poziomach, tak jak w organizmie człowieka.

Obecnie wyróżnia się wiele metod trójwymiarowych hodowli komórkowych, w tym hodowli sferoidalnych oraz opartych na rusztowaniach. Hodowle 3D oparte na rusztowaniach hydrożelowych umożliwiają jednorodne rozmieszczenie komórek w całej objętości hydrożelu, dobrą dyfuzję małych cząsteczek i hydrofilowych cząsteczek biologicznych. Ponadto hydrożele są transparentne, co pozwala na wykorzystanie technik mikroskopowych podczas hodowli.

Analiza hodowli komórkowych opiera się przede wszystkim na metodach optycznych, analizie mikroskopowej morfologii komórek, ich barwieniu i testach punktu końcowego. Ważnym aspektem jest możliwość wykorzystania czujników pozwalających m.in. na pomiar zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych podczas całej hodowli. W ostatnich latach wzrosło wykorzystanie metod elektrochemicznych w analizie hodowli komórkowej, ze względu na możliwość miniaturyzacji oraz integracji czujników elektrochemicznych w układach mikroprzepływowych. Ich dużą zaletą jest analiza w czasie rzeczywistym. Pomiary

zmian stężenia tlenu i glukozy mogą dostarczyć wielu informacji na temat żywotności komórek, które mogą być wykorzystane w testach cytotoksyczności podczas testowania nowych leków.

Niniejsza praca doktorska porusza tematykę wykorzystania technik elektrochemicznych w analizie parametrów metabolicznych komórek w hodowlach komórkowych *in vitro*, a w szczególności zmian stężenia tlenu. Głównym celem pracy było opracowanie macierzy elektrodowej, która umożliwiłaby jednoczesną analizę stężenia tlenu oraz glukozy w trójwymiarowej hodowli komórkowej na rusztowaniach hydrożelowych. Kluczowym aspektem było uzyskanie powtarzalnego sygnału na tych samych czujnikach tlenu na jednej macierzy. W ramach pracy opracowano również warstwę przeciwporostową powierzchni elektrod, pozwalającą na długoterminowe pomiary w pożywce hodowlanej.

Praca doktorska składa się z sześciu rozdziałów. Rozdział pierwszy jest rozdziałem teoretycznym, w którym opisywane są metody hodowli komórkowych – różnice pomiędzy dwuwymiarową oraz trójwymiarową hodowlą komórkową, metody hodowli sferoidalnych oraz opartych na rusztowaniach, metody analizy hodowli komórkowej, a także wykorzystywane metody badawcze.

Kolejne rozdziały przedstawiają wyniki badań własnych. Rozdział drugi opisuje wpływ polimerów przewodzących oraz makrocyklicznych związków metali przejściowych na przesunięcie potencjału początku fali katalitycznej w procesie redukcji tlenu na komercyjnych elektrodach złotych, elektrodach złotych wytworzonych metodą napyłania w wysokiej próżni oraz elektrodach wytworzonych metodą druku 3D. Przedstawiona jest również charakterystyka elektrod LIG oraz próby wytworzenia elektrod metodą fotolitografii.

Rozdział trzeci przedstawia badania nad warstwami przeciwporostowymi. Opisane są badania 11 wybranych materiałów o właściwościach przeciwporostowych oraz wpływ pożywki hodowlanej na ich stabilność. W dalszej części rozdziału przedstawiony jest wpływ środowiska hodowli komórkowej komórek linii HeLa na warstwy TMOS, PLLA oraz PLL-PEG. Opisane wyniki zostały opublikowane publikacji nr 1.

Rozdział czwarty opisuje badania z wykorzystaniem elektrod złotych napyłanych metodą w wysokiej próżni w dwuwymiarowych hodowlach komórkowych. Przedstawiono wyniki dotyczące pomiarów analizy stężenia tlenu, glukozy oraz adhezji komórek do podłoża prowadzonych w hodowli komórek linii HepG2 – w warunkach kontrolnych (18% O₂), w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂), a następnie podczas inkubacji z roztworem DMSO oraz acetaminofenonu.

Rozdział piąty opisuje badania z wykorzystaniem syntetycznego hydrożelu GelMa. Pierwsza część rozdziału jest poświęcona ocenie wpływu inkubacji acetaminofenonu na komórki linii HepG2 enkapsulowane w hydrożelu GelMa z wykorzystaniem analizy mikroskopowej, barwienia różnicowego i testu cytotoksyczności. W drugiej części przedstawione są pomiary elektrochemiczne redukcji tlenu w hodowli 3D w obniżonych warunkach stężenia tlenu (5% O₂) oraz podczas inkubacji z roztworem acetaminofenonu.

Ostatni rozdział jest rozdziałem podsumowującym. Przedstawione są w nim najważniejsze wnioski oraz propozycje dotyczące zmiany w architekturze wykorzystywanego układu pomiarowego.

Niniejsza praca doktorska powstała w ramach projektu NCBiR LIDER/38/01381/L-9/17/NCBR/2018 „Trójwymiarowe podłoża ze zintegrowanym multielektrodowym układem pomiarowym do zastosowań w hodowlach komórkowych i farmacji”.

Prace badawcze opisane w rozdziale 5 oraz niektóre eksperymenty z rozdziału 4 zostały wykonane podczas stażu badawczego na Uniwersytecie Leibniz w Hanowerze w Niemczech w Instytucie Chemii Technicznej w grupie badawczej Dr Antoniny Lavrentiev. Wyjazd odbył się w ramach programu Erasmus+.

W trakcie studiów odbył się również staż badawczy na Uniwersytecie Presbiteriana Mackenzie w São Paulo, w grupie Dr Cecیلی de Carvalho Castro e Silva w ramach programu STER Umiędzynarodowianie Szkół Doktorskich NAWA. W ramach stażu wykonano elektrody LIG, opisane w rozdziale 2.



1. Wykorzystanie hodowli komórkowych w badaniach naukowych

1.1. Wprowadzenie

Opracowanie metod hodowli komórkowej *in vitro* stanowi jedno z najważniejszych osiągnięć biologii eksperymentalnej poprzedniego stulecia. Pozwala ona na wyizolowanie komórek z tkanek zwierzęcych lub roślinnych oraz ich namnożenie i hodowlę w warunkach fizjologicznych poza organizmem macierzystym^[1]. Wyizolowane komórki hodowane są w pożywkach hodowlanych (ang. *cell culture medium*), które zawierają składniki odżywcze, hormony oraz czynniki wzrostu niezbędne do ich prawidłowego wzrostu^[2]. Większość komórek tworzy kultury adherentne, które rosną w postaci monowarstwy (struktura płaska, dwu-wymiarowa), na płaskiej powierzchni butelki hodowlanej, która zapewnia mechaniczne wsparcie dla wzrostu komórek. Pozostałe komórki np. komórki krwiotwórcze szpiku rosną w postaci wolnej w zawieszynie.

Początki hodowli komórkowych sięgają końca XIX wieku, kiedy zostały podjęte pierwsze próby wyizolowania komórek z tkanek czy umieszczenia ich całych fragmentów w naturalnych pożywkach, takich jak osocze lub limfa^[3,4]. Jednym z przełomowych wydarzeń było wyizolowanie tkanki embrionalnej żaby w 1907 roku przez Rossa Granville'a Harrisona^[5], z której mogły wytworzyć się włókna nerwowe (np. rdzeń) oraz jednoczesna obserwacja powstawania i rozwoju tej tkanki nerwowej poza macierzystym organizmem^[6]. Innym ważnym zdarzeniem była możliwość kilkudniowej hodowli embrionu kurczęcia w ogrzewanym roztworze soli fizjologicznej przez Wilhelma Roux^[7].

Oba te wydarzenia stanowiły początek wykorzystania badań *in vitro* w badaniach biologicznych, szczególnie wirusologii. Możliwość hodowli komórek poza organizmem żywym miała kluczowe znaczenie nie tylko w rozwoju szczepionek i leków, ale także w zrozumieniu procesów biochemicznych w ludzkim organizmie. Opracowanie odpowiednich pożywek hodowlanych^[2], zastosowanie odpowiednich warunków do hodowli takich jak temperatura, pH czy stała zawartość CO₂ w atmosferze, tak aby warunki hodowli były jak najbardziej zbliżone do warunków fizjologicznych; sterylność pracy oraz wykorzystanie odpowiednich naczyń hodowlanych^[8], przyczyniły się do ograniczenia zakażeń oraz do wydłużenia życia otrzymanych linii komórkowych.

Przełomowym momentem w rozwoju technik hodowli komórkowej było pobranie komórek nowotworowych od pacjentki chorej na nowotwór szyjki macicy – Henrietty Lacks^[9]. Wyizolowane komórki okazały się doskonałym narzędziem badawczym, bowiem w przeciwieństwie do innych komórek, wyróżniały się szybkim tempem wzrostu, nieskończoną liczbą podziałów oraz łatwą adaptacją do warunków hodowli. Umożliwiły one ogromny postęp w badaniach biomedycznych bez ciągłej konieczności izolacji nowych komórek z tkanek, uzyskując wysoką żywotność komórek w hodowli przy braku zmienności genotypowego i fenotypowego materiału badawczego pomiędzy eksperymentami^[1,10].

W przeciwieństwie do komórek nowotworowych, komórki pierwotne bezpośrednio izolowane z żywej tkanki są bardziej reprezentatywnym modelem warunków *in vivo*. Zachowują one fenotypową niezmienność, funkcję oraz markery komórkowe przez kilka pierwszych tygodni^[1,10]. Chociaż koszty badań z udziałem komórek pierwotnych są znacznie wyższe w porównaniu do badań z komórkami nowotworowymi, to otrzymane wyniki są zdecydowanie bardziej zbliżone do warunków *in vivo*. Istotną wadą komórek pierwotnych jest ich ograniczony potencjał wzrostu i odmienne zachowanie w stosunku do tych samych bodźców (np. cytokin prozapalnych).

W ludzkich komórkach somatycznych, po każdym cyklu komórkowym fragment chromosomu znajdujący się na jego końcu (telomer), który chroni chromosomy przed degradacją lub zapobiega aberracjom chromosomowym, ulega skróceniu w wyniku problemu replikacji końca^[11]. Niedostateczna ekspresja telomerazy, enzymu odpowiadającego za odbudowę telomerów, powoduje ich skrócenie z każdym podziałem komórkowym. Gdy telomer osiągnie pewną ograniczoną długość, zwaną „limitem Hayflicka” następuje zahamowanie proliferacji i rozpoczyna się mechanizm apoptozy komórkowej^[12]. Komórki nowotworowe charakteryzują się wysoką aktywnością telomerazy, która aktywnie dobudowuje skracany telomer. W efekcie komórki nowotworowe nabywają cechę nieśmiertelności.

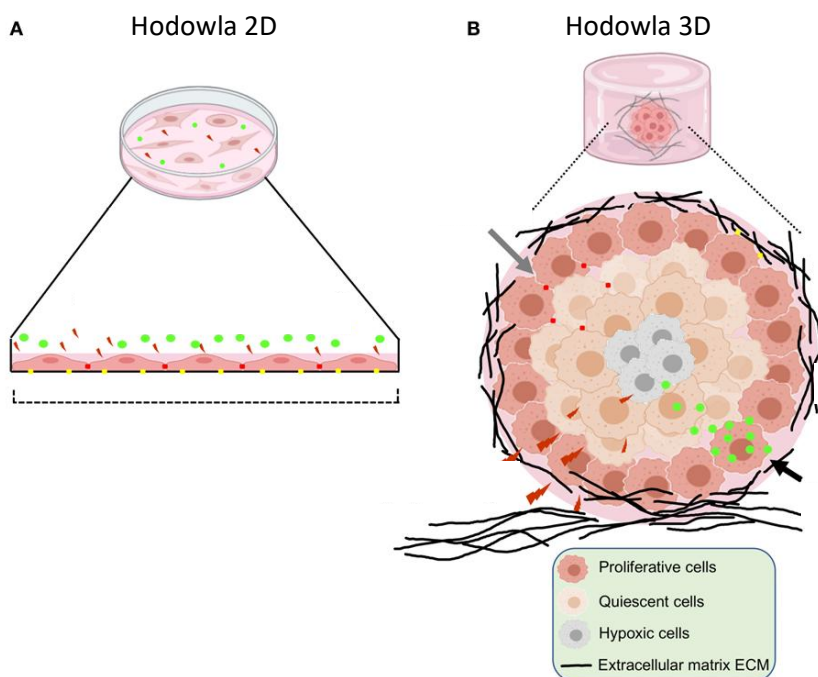
Unieśmiertelnienie komórek prowadzi do uzyskania tzw. stałej linii komórkowej, która zapewnia niezmienność genotypową oraz fenotypową materiału badawczego. Można ją uzyskać w sposób sztuczny oraz indukowany poprzez wymuszenie ekspresji odwrotnej transkryptazy telomerazy (TERT ang. *telomerase reverse transcriptase*)^[13] lub nadmierną ekspresję wirusowych onkogenów w celu zakłócenia kontroli cyklu komórkowego^[14]. Transfekcja, czyli wprowadzenie onkogennych wirusów do komórek może być przeprowadzona na kilka sposobów takich jak: fuzja komórek, mikroiniekcja DNA/RNA, wprowadzenie wektorów retrowirusami lub adenowirusami, elektroporacja, enkapsulacja DNA w liposomach lub metodami

precypitacji fosforanem wapnia lub fosforanem strontu^[15]. Unieśmiertelnienie komórek można uzyskać również z wykorzystaniem czynników kancerogennych oraz na drodze napromieniowania^[16].

Kolejnym znaczącym wkładem w rozwój nauk biologicznych było uzyskanie w 1975 roku hybrydowych linii komórkowych, które wytwarzały przeciwciała. W kolejnych latach uzyskano komórki macierzyste pochodzące z zarodków mysich (1981), oraz ludzkich (*ang. Embryonic stem cells, ESC*) w 1998 roku^[17]. Obecnie komórki macierzyste są szeroko wykorzystywane w modelowaniu chorób, badaniach przesiewowych leków oraz w terapii komórkami macierzystymi. Pod wpływem odpowiednich czynników mogą się różnicować się we wszystkie znane tkanki. W 2006 r. Shinya Yamanaka opracował nową technologię tworząc „indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste” (iPSC, *ang. induced pluripotent stem cells*). Po wprowadzeniu odpowiednich genów do komórek somatycznych, następuje ich przeprogramowanie do stanu pierwotnego, a następnie przekształcenie się w komórki pluripotencjalne. Zarówno iPSC mysie, jak i ludzkie mają zdolność różnicowania się do wielu typów komórek we wszystkie tkanki prócz trofoblastu^[18]. Obecnie coraz częściej wykorzystuje się komórki krwi, zamiast komórek somatycznych.

1.2. Porównanie hodowli dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych *in vitro*

Dwuwymiarowe hodowle komórkowe (2D) są dobrze poznane, a ze względu na niskie koszty hodowli, prostotę prowadzenia badań, wysoką powtarzalność wyników oraz łatwość monitorowania żywotności i morfologii komórek są powszechnie wykorzystywane w rutynowych testach. Niestety jest to uproszczony model komórkowy, który niedokładnie odwzorowuje warunki *in vivo*. W organizmach wielokomórkowych komórki oddziałują ze sobą poprzez macierz zewnątrzkomórkową (ECM, *ang. Extracellular matrix*), która składa się m.in. z białek adhezyjnych, proteoglikanów, kolagenów zewnątrzkomórkowych oraz czynników wzrostu, cytokin i chemokin (Rysunek 1.1.). Po izolacji komórek, te naturalne struktury tkanek są tracone, co może mieć istotny wpływ na interakcje komórka-komórka i komórka-macierz^[19–22], odpowiedzialne za wiele funkcji komórkowych m.in. proliferację i różnicowanie komórek, ekspresję genów i białek, reakcję na bodźce czy metabolizm leków^[22–26].



Rysunek 1.1. Schematyczne przedstawienie porównania hodowli w monowarstwie (2D) oraz trójwymiarowej hodowli komórkowej. Rysunek wykonano na podstawie: [27].

Proces izolacji komórek z tkanki wiąże się ze zmianą warunków fizycznych i chemicznych otoczenia, a co za tym idzie nieprawidłowym odbiorem bodźców mechanicznych^[20,28], ponieważ komórki nie znajdują się już w naturalnym środowisku 3D. Tracą one swoją polarność i zróżnicowany fenotyp^[29]. Komórki adherentne mają zdolność do przekształcania sił mechanicznych swojego otoczenia w sygnały biochemiczne poprzez transdukcję mechaniczną^[30]. W hodowli 2D komórki nienowotworowe wykrywają sztywność podłoża, prowadząc do przebudowy cytoszkieletu i przyjęcia spłaszczonej morfologii na powierzchniach płaskich^[31], podczas gdy w warunkach *in vivo* proces migracji jest zależny od mechanicznych i sterycznych właściwości matrycy. W hodowli 2D głównie jest ona zależna od białek adhezyjnych (integryny)^[23]. Wyraźnie jest to widoczne na przykładzie hodowli fibroblastów, które różnią się rozmieszczeniem białek adhezyjnych w hodowli 2D i 3D, co skutkuje przyjęciem różnych kształtów na podłożu 2D^[32,33]. Zmiany wewnątrz komórki zachodzą również na poziomie molekularnym, co można zaobserwować w zmianach splicingu mRNA, poziomach ekspresji białek i genów, topologii i biochemii komórek^[34–37]. Zmiana morfologii komórek indukuje zmiany nie tylko w organizacji struktur wewnątrz komórek, ale także w wielu funkcjach komórek, wydzielaniu i sygnalizacji^[38,39].

Zmiany w różnicowaniu komórek *in vitro* można zaobserwować na przykładzie komórek macierzystych w hodowlach trójwymiarowych. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, ang. *Mesenchyma stem cells*) hodowane w sferoidach (trójwymiarowych strukturach komórkowych) wykazują znaczne różnice w morfologii i ekspresji genów w porównaniu do MSC w hodowli 2D. MSC często zmniejszają swoją zdolność replikacyjną podczas hodowli 2D, co uniemożliwia ich wykorzystanie w badaniach^[40]. Podobnie wykazano ważną rolę osteocytów, dojrzałych komórek tkanki kostnej, w przerzutach do kości i zastosowaniach inżynierii tkankowej, obserwując mechanizmy różnicowania ludzkich osteoblastów (komórek kościotwórczych) w osteocyty w hodowli 3D^[41].

Hodowle 3D umożliwiają zachowanie odpowiedniej polarności komórek. Ich polaryzacja *in vivo* zależy zarówno od typu komórki, jak i otaczającego mikrośrodowiska. Komórki nabłonkowe są spolaryzowane i charakteryzują się powierzchnią szczytową, która jest zwrócona w stronę płynów ustrojowych lub światła narządu i powierzchnią podstawną skierowaną zazwyczaj w stronę tkanki łącznej. Powierzchnia podstawna jest położona na błonie podstawnej, zbudowanej z kolagenu typu IV^[42]. W przypadku hodowli 2D polaryzacja komórek nabłonkowych zostaje utracona, natomiast hodowla 3D pozwala na ponowne jej odtworzenie^[43]. Zupełnie inaczej jest w przypadku fibroblastów, które w hodowli 2D przyjmują tzw. górną (grzbietową) i dolną (brzuszną) powierzchnię. Po ponownym umieszczeniu w mezenchymalnej matrycy 3D fibroblasty tracą sztuczną polaryzację grzbietowo-boczną i odzyskują swoją morfologię *in vivo*^[44,45].

Wzrost komórek w monowarstwie powoduje identyczną ekspozycję wszystkich komórek na tę samą ilość czynników wzrostu i składników odżywczych z pożywki. Natomiast w warunkach *in vivo* w przypadku komórek nowotworowych ich dostępność jest bardziej zróżnicowana ze względu na naturalną architekturę masy guza^[22]. Istotnym czynnikiem jest również dostęp do tlenu. W przypadku warunków *in vivo* często panują warunki niedotlenienia, lub dostępność tlenu jest ograniczona, a w warunkach *in vitro* dostęp do tlenu jest nieograniczony^[46,47]. W hodowli 2D większość komórek znajduje się na tym samym etapie rozwoju, w przeciwieństwie do warunków *in vivo*^[28,48,49].

Obecność ECM może również wpływać na odpowiedź komórkową podczas badania aktywności leków, powodując wzrost oporności komórek na badane związki lub wzmacniając ich skuteczność^[50]. Bezpośrednia ekspozycja komórek na leki w hodowlach 2D skutkuje ich zmniejszoną opornością na leki^[49,51,52], a ponadto może indukować przedwczesną apoptozę^[28]. Leki cytostatyczne, takie jak cisplatyna, doksorubicyna i 5-fluorouracyl, wykazują różnice w aktywności

przeciwnowotworowej w hodowli sferoidalnej (3D), jak i w monowarstwie^[25]. Może mieć na to wpływ kilka czynników, takich jak geometria systemu, w tym niewystarczająca dystrybucja leków w obrębie sferoidu^[53], niedotleniony rdzeń w jego wnętrzu^[54] lub indukowanie wydzielania czynnika wzrostu^[55]. Zróżnicowane rozmieszczenie receptorów na powierzchni komórek w systemach 2D i 3D wpływa na skuteczność ich wiązania z lekiem^[50]. W Tabeli 1.1. przedstawiono najważniejsze różnice pomiędzy hodowlą 2D i 3D.

Tabela 1.1. Porównanie hodowli dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych

Typ Hodowli:	2D	3D	Odniesienia:
Koszty prowadzenia hodowli	Tanie, komercyjnie dostępne butelki i płytki hodowlane, pożywki i testy komórkowe	Czasochłonne, indywidualnie zaprojektowana architektura układu zwiększa koszty, brak standardowych testów	[20]
Podobieństwo do warunków <i>in vivo</i>	Niewielkie, niezachowane naturalne struktury tkanek	Hodowle 3D dokładniej naśladują tkanki i narządy <i>in vivo</i>	[20,21]
Interakcje komórkowe odpowiedzialne za wiele funkcji komórkowych	Brak pełnej interakcji komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa.	Przywrócenie interakcji komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa	[19,20,22,28]
Dostęp do pożywki i tlenu	- Nieograniczony	- Możliwa obecność gradientu składników odżywczych	[28,46–49]
	- Taka sama ilość składników odżywczych i czynników wzrostu dla wszystkich komórek.	- Zróżnicowany dostęp do tlenu, składników odżywczych, metabolitów i cząsteczek sygnalizacyjnych	
	- Zwiększone prawdopodobieństwo, że więcej komórek jest na tym samym etapie cyklu komórkowego.	- Różne etapy cyklu komórkowego (np. nekrotyczny, proliferacyjny)	

Charakterystyka komórek	Komórki spłaszczone, wydłużone, brak zróżnicowanego fenotypu, odmienna polaryzacja niż warunkach <i>in vivo</i> Słabe różnicowanie MSC	Zachowany fenotyp, polarność i morfologia - zbliżone do warunków <i>in vivo</i> Występuje heterogeniczność	[22,31,43–45] [40,41]
Mechanizmy molekularne	Zmiany w splicingu mRNA, ekspresji białek i genów, topologii i biochemii komórek	Podobna ekspresja genów, splicing, topologia i biochemia komórek jak w modelach <i>in vivo</i>	[32–35]
Działanie leków na komórki	Niewielka oporność na leki, Możliwa indukcja wczesnej apoptozy	Komórki mają większą oporność na leczenie farmakologiczne, Dokładniejsze odwzorowanie działania leku	[28,49–52]

1.3. Metody otrzymywania trójwymiarowych hodowli komórkowych

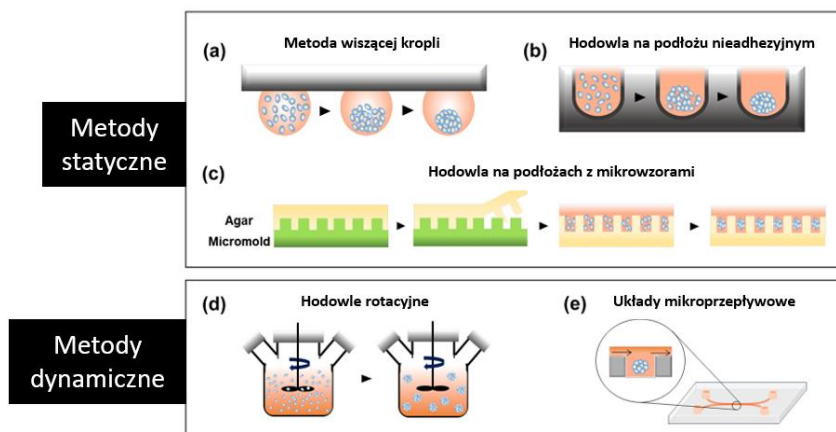
Ze względu na niedokładne odwzorowanie fizjologicznych warunków przez dwuwymiarowe hodowle komórkowe, w badaniach nad opracowaniem nowych środków leczniczych lub szczepionek wykorzystuje się często model zwierzęcy. Jest on szczególnie przydatny podczas analizy farmakokinetycznej, czyli wyznaczenia drogi substancji leczniczej w organizmie. Jest on przedstawiany za pomocą akronimu ADME (ang. *adsorption, distribution, metabolism, excretion*) czyli wchłanianie, dystrybucja, metabolizm oraz wydalanie).

Badania z udziałem zwierząt od lat są przedmiotem krytyki, głównie ze względów etycznych, ale również na niedokładne odwzorowanie fizjologii człowieka. Z tego względu od lat prowadzone są badania nad opracowaniem trójwymiarowego (3D) modelu hodowli komórkowej, który jak wykazano dokładniej odzwierciedla warunki *in vivo*. Opracowano wiele modeli trójwymiarowych hodowli komórkowych, w tym sferoidy (ang. *spheroids*), ko-kultury (model złożony z co najmniej dwóch rodzajów komórek), kultury 3D na podłożu hydrożelowym lub polimerowym, układy w mikroprzepływie, organoidy i systemy *organ-on-a-chip*^[56,57].

1.3.1. Metody oparte na naturalnych właściwościach komórek do agregacji - sferoidy

Jednym z najbardziej powszechnych modelowych układów 3D są sferoidy czyli sferyczne agregaty komórkowe. Są to samoorganizujące się skupiska komórek, które tworzą się w warunkach uniemożliwiających przyleganie komórek do podłoża^[57]. Podstawową rolę w tworzeniu sferoidów odgrywają właściwości adhezyjne komórek i białek cytoszkieletu, które są odpowiedzialne za integralność mechaniczną poprzez generowanie naprężeń mechanicznych w agregacie. W wielu badaniach sferoidy są traktowane jako tkanka unienaczyniona, w której nieefektywny transport dyfuzyjny tlenu i małych cząsteczek prowadzi do niedoboru składników odżywczych i akumulacji metabolitów w ich centralnej części. Sferyczna geometria hodowli stanowi doskonały model dla dynamicznych procesów zachodzących w guzach litych^[58], szczególnie pozbawionych naczyń krwionośnych. Sferoidy komórek nowotworowych są dobrym modelem do badania procesu angiogenezy zachodzącej w początkowo unienaczynionej tkance oraz do uzyskiwania kultur naśladujących guzy *in vivo* pod względem heterogeniczności komórkowej ze względu na wykorzystanie różnych populacji komórek do tworzenia sferoidów, takich jak komórki nowotworowe i fibroblasty, monocyty lub komórki śródbłónka. W porównaniu do kultur dwuwymiarowych, sferoidy charakteryzują się zwiększoną odpornością na chemio- i radioterapię^[57].

Istnieje kilka metod uzyskiwania hodowli sferoidalnych (Rysunek 1.2.), w tym metoda wiszącej kropli (ang. *hanging drop*), hodowle rotacyjne, w butelce z mieszadłem lub w butelce obracającej się rotacyjnie wokół osi poziomej; hodowla na podłożu nieadhezyjnym (ang. *Liquid overlay*) takim jak agar, agaroz lub niektóre syntetyczne polimery (np. poly-HEMA), dodatek nanowłókien polimerowych oraz zawieszenie komórek w żelach białkowych lub peptydowych^[57].



Rysunek 1.2. Metody hodowli sferoidalnych – metoda wiszącej kropli (A), hodowla na podłożu nieadhezyjnym (B), hodowla na podłożach z mikrowzorami (C), hodowle rotacyjne (D) oraz w układach mikroprzepływowych. Rysunek wykonano na podstawie: [56].

Jedną z najczęściej używanych metod jest metoda wiszącej kropli, która pozwala na uzyskanie dobrze kontrolowanej wielkości sferoidów i ko-kultur różnych komórek^[56,57]. Choć nie wymaga ona specjalistycznego sprzętu, jest metodą czasochłonną i nie pozwala na uzyskanie sferoidów na dużą skalę. Metoda ta pozwala jedynie na uzyskanie sferycznej geometrii hodowli i prowadzi do powstania środowiska o wysokiej sile ścinającej. Hodowlę tworzy się poprzez umieszczenie kropli zawiesiny komórek wewnątrz sterylnej powierzchni pokrywy szalki hodowlanej lub płytki wielodołkowej. Po odwróceniu płytki krople są utrzymywane razem przez napięcie powierzchniowe, a komórki są skoncentrowane na dnie kropli poprzez siły grawitacji^[59]. Obecnie coraz częściej wykorzystywane są komercyjnie dostępne płytki m.in. płytki wiszące Perfecta3D[®], systemy wiszącej kropli GravityPLUS[™] lub wiszące płytki SPL3D[™]. Umożliwiają one hodowlę sferoidów metodą wiszącej kropli na większą skalę o dużej powtarzalności. Odpowiednio zaprojektowany kształt płytki pozwala na stabilną hodowlę sferoidów i minimalizuje parowanie^[56]. Inną możliwością są 96-dołkowe okrągłodenne mikropłytki, które pozwalają na kontrolowanie rozmiarów sferoidu, utrzymując go na dnie dołka. Ułatwia to wymianę pożywki, bez uszkodzenia kultury.

Atrakcyjną metodą również wydaje się metoda hodowli na podłożu nieadhezyjnym, ze względu na niskokosztowość metody, łatwość w użyciu oraz możliwość sterylizacji w autoklawie. Niestety hodowle z wykorzystaniem agaru czy agarozy mogą być wykorzystane tylko przez kilka dni^[56]. Znacznie lepszym odpowiednikiem są syntetyczne polimery (np. poly-HEMA), które choć wymagają długiego

przygotowania, umożliwiają długoterminową hodowlę^[21,60]. Dostępne są również komercyjne układy do hodowli na nieadhezyjnych podłożach m.in. mikropłytki Nunclon™ Sphera™ z dnem w kształcie litery U, mikropłytki sferoidalne Corning® lub płytki dołkowe Biofloat™.

Hodowla rotacyjna w bioreaktorach pozwala na uzyskanie sferoidów na większą skalę, jednak czas takiej hodowli jest bardzo długi. Dodatkowo niemożliwa jest precyzyjna kontrola wielkości i kształtu sferoidu, a komórki wrażliwe na naprężenia ścinające nie mogą być wykorzystywane.

1.3.2. Metody oparte na rusztowaniach

Metody hodowli sferoidów opierają się na samoagregacji komórek i nie są dodatkowo wzbogacane w macierz zewnątrzkomórkową (ECM), zauważono jednak, że część komórek wydzielają białka ECM^[61], umożliwiając naturalne interakcje komórka-ECM. Brak macierzy zewnątrzkomórkowej może negatywnie wpływać na wzrost komórek, prowadząc często do apoptozy. Przykładem są fibroblasty, które wykazują ograniczony wzrost w hodowlach bez ECM^[62]. Regulacja proliferacji, różnicowania, sygnalizacji komórkowej i organizacji cytoszkieletu jest wynikiem dynamicznych zmian składników ECM zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i podczas stanów chorobowych^[49,63,64]. Szczególnie ważne są glikoproteiny, czynniki wzrostu wydzielane przez ECM (np. transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β , ang. *transforming growth factor -beta*), czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, ang. *platelet derived growth factor*), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, ang. *hepatocyte growth factor*), enzymy proteolityczne i inhibitory proteaz^[49]. Obecność ECM jest szczególnie ważna w modelu chorób nowotworowych *in vitro*^[65,66]. Może znacząco wpłynąć na odpowiedź komórek po podaniu leków np. zwiększając ich skuteczność, zmieniając mechanizm działania lub powodując oporność^[67,68]. Adhezja między komórkami a białkami ECM, w której pośredniczy głównie system receptorów transbłonowych integryn, jest ważnym czynnikiem modulującym odpowiedź na chemioterapeutyki i terapie celowane w onkologii lub na inne podejścia terapeutyczne, takie jak immunoterapia, radioterapia lub radiochemioterapia^[69]. Ważnym aspektem ECM jest również regulacja przestrzennego rozmieszczenia składników odżywczych, gazów (takich jak tlen i tlenek azotu) oraz rozpuszczalnych cząsteczek efektorowych. Odpowiednie gradienty są niezbędne do regulacji podstawowych procesów komórkowych^[24].

Wprowadzenie macierzy zewnątrzkomórkowej do modelu hodowli kultur 3D rozszerza możliwości tworzenia bardziej fizjologicznych warunków. Zastosowanie

różnych biomateriałów, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego, zapewnia mechaniczne wsparcie dla komórek i przyczynia się do ich wzrostu, adhezji i migracji we wszystkich kierunkach^[49]. Macierz zewnątrzkomórkowa ma inny skład białek w zależności od rodzaju tkanki^[24,70]. Syntetyczne biomateriały mogą być wzbogacone w czynniki wzrostu lub biologicznie aktywne cząsteczki, które zwiększają proliferację komórek lub promują określony fenotyp komórek^[49].

Rusztowania czyli tzw. scaffolds (ang. *scaffolds*), są to fizyczne, trójwymiarowe podłoża do hodowli komórek, imitujące naturalne środowisko tkanki w organizmie. Pochodzące z naturalnych źródeł w szczególności kolagen typu I oraz typu IV, żełe fibrynowe, kwas hialuronowy lub stromalny ECM^[24], są zwykle pierwszym wyborem jako matryca 3D. Mają naturalnie występujące ligandy adhezyjne i są łatwo przemodelowywane przez komórki, by nadać im odpowiednią strukturę i właściwości mechaniczne. Zastosowanie naturalnych biomateriałów jest ograniczone ze względu utrudnioną modyfikację ich struktury. Przykładem może być kolagen, dla którego niemożliwa jest zmiana sztywności bez jednoczesnej zmiany porowatości i wprowadzenia dodatkowych ligandów adhezyjnych. Dodatkowo naturalne polimery charakteryzują się często słabą wytrzymałością mechaniczną, a także są wrażliwe na działanie zmiennego pH i podwyższonej temperatury^[71].

Biomateriały syntetyczne pozwalają na precyzyjną kontrolę różnych właściwości materiału takich jak rozmiar i rozmieszczenie porów, geometria, właściwości mechaniczne (wytrzymałość na rozciąganie, moduł sprężystości), możliwość wbudowania ligandów stymulujących komórki i białka ECM. Szeroki wybór biomateriałów pozwala dobrać odpowiedniego materiału pod kątem modelu i funkcji tkanek. Biomateriały powinny być biokompatybilne i charakteryzować się odpowiednią biodegradowalnością. Jako sztuczne rusztowania są przede wszystkim stosowane polimery (np. hydrożele, PEG), materiały ceramiczne (np. bioaktywne szkła) lub tytan. Niestety ich nienaturalny charakter może powodować niechciane oddziaływania między komórkami a biomateriałami^[72], a także wydzielanie własnych białek ECM, co może doprowadzić do zmiany fenotypu komórek^[73].

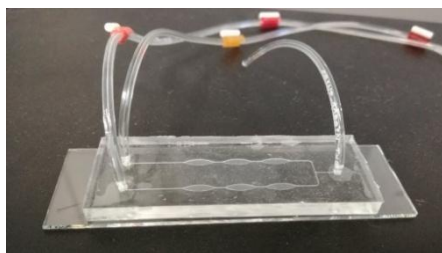
Hydrożele są szeroko stosowane jako rusztowania dla kultur komórkowych 3D, ze względu na podobne właściwości do natywnego ECM^[64]. Są to układy koloidowe, które składają się z wysokouwodnionych hydrofilowych polimerów naturalnych (np. kolagen, kwas hialuronowy, fibrynogen, alginiany) lub syntetycznych (np. alkohol poliwinylowy (PVA), glikol polietylenowy (PEG))^[74,75]. Otrzymywanie hydrożeli następuje poprzez wymieszanie zawiesiny komórkowej z prekursorem hydrożelu, a następnie ekspozycję na różne czynniki zewnętrzne takich jak promieniowanie UV, określona temperatura czy obecność czynników sieciujących^[76]. Zaletą

wykorzystania hydrożeli jest ich przejrzystość, umożliwiającą obserwacje rosnących w nich komórek, jednorodne rozmieszczenie komórek w całej objętości hydrożelu^[74] oraz dobra dyfuzja małych cząsteczek i hydrofilowych cząsteczek biologicznych^[77]. Głównym ograniczeniem w stosowaniu hydrożeli na bazie naturalnych biomateriałów jest ich zróżnicowanie między partiami oraz ograniczona możliwość kontroli właściwości biofizycznych. Wykorzystanie syntetycznych hydrożeli umożliwia modulację właściwości biofizycznych na przykład takich jak sztywność hydrożelu, jednak nie oddają one złożonej struktury ECM^[78].

Rusztowania można również uzyskać metodą tzw. prefabrykacji lub modułów (ang. *prefabricated scaffolds*) z wykorzystaniem biodruku 3D (ang. *bioprinting*), stereolitografii, separacji faz polimeru, liofilizacji, spieniania gazu (ang. *gas foaming*)^[79]. Szczególnie często wykorzystywaną metodą jest metoda biodruku 3D, która tworzy żywą tkankę przy użyciu technologii addytywnej (druku przestrzennego). Druk 3D może przekształcić modele 3D stworzone przy użyciu projektowania wspomaganego komputerowo (CAD, ang. *Computer Aided Design*) w obiekty fizyczne poprzez osadzanie hydrożelu zawierającego komórki, zwanego również biotuszem, warstwa po warstwie^[80]. Jako biotusz, wykorzystuje się takie hydrożele jak kolagen i jego pochodne, chitozan, alginian lub agaroza. Ze względu na zmniejszoną wytrzymałość mechaniczną hydrożeli, są one łączone z syntetycznymi polimerami jak PLLA lub PCL wydrukowanym przy użyciu stereolitografii lub modelowania 3D. Mogą one jednak wykazywać niską biokompatybilność i ulegać niekontrolowanej degradacji. Ograniczenia wykorzystania metody biodruku 3D obejmują wyzwania techniczne w szczególności rozdzielczości i szybkości drukowania, a także skalowalności i małą różnorodność dostępnych biomateriałów^[81].

Integracja nauk biologicznych i mikroinżynierii doprowadziła do opracowania urządzeń mikroprzepływowych (Rysunek 1.3.) zaprojektowanych do kontrolowania i manipulowania płynami w mikroskali oraz umożliwiających precyzyjne analizy^[82]. Wytwarzanie kanałów mikroprzepływowych (100 - 1000 μm) opiera się głównie na technikach litograficznych, pozwalających na projektowanie nieskończonej liczby geometrii^[83]. Metoda miękkiej litografii (ang. *soft lithography*) umożliwia szybkie prototypowanie i przenoszenie mikrowzorów w elastomerowym materiale na bazie - poli(dimetylosiloksanu) (PDMS)^[84,85]. Wielką zaletą PDMS jest jego biokompatybilność, stabilność chemiczna, przepuszczalność dla gazów i integralność z pomiarami optycznymi, w tym niska autofluorescencja i transparentność w szerokim zakresie widma UV-VIS umożliwiającą bezpośrednie obrazowanie komórek w układach do hodowli komórkowej^[86]. Mikrosystemy przepływowe umożliwiają dostarczanie w trybie ciągłym świeżych substancji odżywczych, tlenu oraz usuwanie produktów przemiany materii czy metabolitów z hodowli^[83]. Uzyskanie

trójwymiarowej hodowli komórek w układach mikroprzepływowych wymaga zastosowania specjalnej geometrii układu poprzez wykorzystanie mikrorowków (ang. *microgrooves*) lub mikrosłupków (ang. *micropillars*)^[87,88]. Innym sposobem może być hodowla na podłożu hydrożelowym, poprzez wprowadzenie zawiesiny komórek wymieszanej z prekursorem hydrożelu lub hodowla sfereoidów w mikrokomorach. Mikrosystemy przepływowe stały się cennym narzędziem w modelowaniu ludzkich tkanek, zwłaszcza modeli naczyń krwionośnych, wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych leków i analizie pojedynczych cząsteczek.



Rysunek 1.3. Przykładowy układ mikroprzepływowy[Zdjęcie własne].

Początkowo układy mikroprzepływowe były wykorzystywane w procesach przemysłowych. Szybko stały się również niezbędnym narzędziem w badaniach biomedycznych. Pozwoliły one na odzwierciedlenie warunków *in vivo*, poprzez hodowanie nie tylko kultur 3D, ale również modeli całych narządów czy tkanek^[89]. Platformy *organ-on-a-chip* zintegrowane z układami mikroprzepływowymi umożliwiły uzyskanie uproszczonych modeli całych narządów lub tkanek, w których można badać ich wybrane funkcje m.in. metabolizm wątroby, perfuzję naczyń płucnych czy funkcję bariery skóry^[90]. Hodowanie całych narządów stało się możliwe dzięki embrionalnym lub indukowanym pluripotencjalnym komórkom macierzystym, które tworzą samoorganizującą się strukturę 3D, naśladującą podstawową złożoność funkcjonalną, strukturalną i biologiczną narządu^[91,92].

1.4. Regulacje prawne dotyczące trójwymiarowych hodowli komórkowych

Modele zwierzęce są szeroko stosowane w badaniach biomedycznych, szczególnie w zrozumieniu patofizjologii chorób człowieka, opracowywaniu nowych substancji leczniczych i nowych metod diagnozowania, a także testowaniu bezpieczeństwa produktów niemiedycznych stosowanych w przemyśle i rolnictwie^[93–95]. Według raportu komisji Europejskiej w 2022 r. wykorzystano łącznie 9 237 542 zwierząt laboratoryjnych (głównie gryzoni, takich jak myszy, szczury, chomiki i świnki morskie) w badaniach biomedycznych i około medycznych. Chociaż jest to znacznie mniej niż w poprzednich latach, liczba zwierząt jest nadal wysoka^[96]. Badania na modelach zwierzęcych są nieocenionym narzędziem, ze względu na informacje dotyczące adsorpcji i metabolizmu leków eksperymentalnych, których nie jest w stanie zapewnić nawet najbardziej zaawansowany model trójwymiarowej hodowli komórkowej. Koncepcja 3R (ang. *Replacement, Reduction, Refinement*), którą opisał w 1959 r. William Russell^[97] zakładała zastosowanie alternatywnych metod, pozwalających uniknąć badań z udziałem zwierząt (ang. *replacement*), ograniczyć ilość zwierząt wykorzystanych w badaniach (ang. *reduction*) i zminimalizować cierpienie jakiego mogą doświadczyć zwierzęta oraz poprawić ich dobrostan (ang. *refinement*) – Rysunek 1.4. Koncepcja ta jest kluczowa nie tylko z etycznego punktu widzenia, ale także ze względu na fizjologiczne i anatomiczne różnice między zwierzętami, a ludźmi.

Regulacje prawne dotyczące udziału zwierząt w badaniach zapoczątkowało w Europie opracowanie Deklaracji Helsińskiej w 1964 r., w której podkreślono, że „badania biomedyczne z udziałem ludzi muszą być zgodne z ogólnie przyjętymi zasadami naukowymi; powinny opierać się na odpowiednich eksperymentach laboratoryjnych i na zwierzętach oraz na wszechstronnej znajomości literatury naukowej”^[98]. Zasadę wykorzystania zwierząt w celach naukowych na terenie Unii Europejskiej określa obecnie Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Na terenie Polski obowiązuje dodatkowo Ustawa z dn. 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015, poz. 266, z późn. zm.). Każde badanie z udziałem zwierząt laboratoryjnych musi również uzyskać zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (LKE).



Rysunek 1.4. Wdrożenie zasady 3R w projektach badań eksperymentalnych. Rysunek wykonano na podstawie: [99].

Wylimowanie badań z udziałem zwierząt w sektorze farmaceutycznym stanowi globalne wyzwanie i wymaga współpracy zarówno przedsiębiorstw farmaceutycznych, jak i organów regulacyjnych, takich jak amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) czy Europejska Agencja Medyczna (EMA, ang. *European Medical Agency*).

Hodowle 3D, organoidy czy technologie *organ-on-a-chip* są biologicznie złożone i charakteryzują się dużą zmiennością. Pomimo komercyjnie dostępnych testów i substancji chemicznych, ich ograniczona odtwarzalność pomiędzy laboratoriami, sprawia, że uzyskane wyniki nie są w pełni wiarygodne w kontekście podejmowania decyzji terapeutycznych. Istotną kwestią w przypadkach klinicznych jest czas, który wpływa na przewagę dostępnej diagnostyki genomicznej. Najbardziej krytycznym aspektem jest nadal brak standaryzacji i walidacji metod hodowli komórek 3D.

Dopiero niedawno EMA powołała nową grupę roboczą ds. „Akceptacji regulacyjnej podejścia nowych metodologii (NAM, ang. *New Approach Methodologies*) w celu ograniczenia testów na zwierzętach”. NAM zdefiniowano jako podejście, metodologię, technologię lub kombinację, które mogą dostarczyć informacji na temat zagrożeń chemicznych i oceny ryzyka bez testów na zwierzętach, w tym wszystkie podejścia *in vitro*.

Obecnie producenci nowych leków, środków terapeutycznych i szczepionek są zobowiązani do potwierdzenia ich skuteczności i bezpieczeństwa dla ludzi, opierając się na testach w tym badań z udziałem zwierząt na etapie przedklinicznym. W czerwcu 2025 r. Europejska Federacja Przemysłu Farmaceutycznego i Stowarzyszeń (EFPIA, ang. *The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*) opublikowała rekomendacje dotyczące stopniowego wycofywania testów na zwierzętach oraz wykorzystania NAM, uwzględniając zacieśnianie współpracy pomiędzy sektorem prywatnym i publicznym, ulepszanie systemów udostępniania danych i ich ochrony oraz zbudowanie zaufania społeczeństwa do bezpieczeństwa leków z wykorzystaniem NAM. W raporcie EFPIA podkreślono, że obecnie żadna alternatywna metoda nie może jednocześnie zastąpić wszystkich testów na zwierzętach. Nakreślony plan rozwoju NAM zakłada określenie rodzajów badań, które można zastąpić dostępnymi technologiami, alternatywnymi do badań na zwierzętach, aby priorytetowo potraktować badania i rozwój w obszarach, w których obiecujące metody bez udziału zwierząt nadal wymagają walidacji oraz wskazać obszary, w których badania naukowe obecnie nie oferują wiarygodnej alternatywy. Przyjęcie modelu alternatywnego prawdopodobnie będzie wymagało przededefiniowania sposobu przeprowadzania oceny ryzyka u ludzi^[100].

Istnieje jednak ryzyko, że przedsiębiorcy na rynku farmaceutycznym wciąż będą sceptycznie nastawieni do wykorzystania technologii NAM, jako jedynej ścieżki oceny ryzyka bezpieczeństwa leków. Od 2019 r. EMA rozpoczęła spotkania dla przedsiębiorstw, zwane Grupą Zadaniową ds. Innowacji EMA (ITF, ang. *Innovation Task Force*), które są okazją do rozpoczęcia dialogu dotyczących innowacyjnego podejścia do oceny skuteczności i bezpieczeństwa leków. Tylko do 2023 r. odbyło się kilka spotkań, a w większości z nich uczestniczyli przedstawiciele małych i średnich przedsiębiorstw. Najczęstszymi tematami omawianymi z EMA były bezpieczeństwo, toksykologia, opracowywania nowych leków i ich skuteczność. Podczas dyskusji pojawił się również temat technologii *liver-on-a-chip* czyli modelu wątroby *in vitro*, naśladujący funkcję i architekturę narządu. Zauważono potrzebę bardzo wczesnego wsparcia z regulacyjnego punktu widzenia, ponieważ część proponowanych modeli *in vitro* została opisana zbyt ogólnie^[101].

Firmy obawiają się publikacji zwłaszcza negatywnych danych na modelach *in vitro*, oraz dodatkowych żądań potwierdzenia oceny ryzyka na modelu zwierzęcym przez organy regulujące. Poza tym utrata danych na wyłączność obarczona jest przede wszystkim dużym kosztem finansowym. Potrzebne są zatem nowe regulacje dotyczące przechowywania i ochrony danych, a także globalne przyzwolenie organów regulujących na wykorzystanie nowych technologii i jednomyślność dotycząca braku wymogu obowiązkowych testów z udziałem zwierząt.

Jednym z ważniejszych etapów regulacji nowych technologii jest walidacja nowych metod badawczych, którym na terenie UE zajmuje się Laboratorium referencyjne UE ds. alternatyw dla badań na zwierzętach (EURL ECVAM ang. *EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing*). Badania z wykorzystaniem technologii *organ-on-a-chip*, są obecnie mało wydajne, a przy tym kosztowne i czasochłonne. Ze względu na wiele możliwości zastosowań jednego układu zalecane jest zdefiniowanie prostego kontekstu zastosowania pozwalającego na jego walidację^[102]. Dodatkowym pomysłem jest stworzenie odrębnych ośrodków zajmujących się testowaniem nowych technologii, które wspomogą transfer technologii *organ-on-a-chip* z laboratoriów badawczych do przemysłu.

1.5. Metody oceny procesów biologicznych na poziomie komórkowym w hodowli komórkowej

1.5.1. Metody oceny procesów biologicznych na poziomie komórkowym w hodowli komórkowej

Analiza morfologiczna komórek jest integralną częścią każdego eksperymentu biologicznego. Pozwala ona na obserwację zarówno całych hodowli komórkowych, jak i pojedynczych elementów komórki. Mikroskopia jasnego pola (ang. *Bright-field microscopy*) jest podstawową techniką obrazowania pojedynczych komórek i tkanek, jednak ze względu na niską zdolność rozdzielczą, możliwość precyzyjnej obserwacji struktur wewnątrzkomórkowych jest ograniczona. Mikroskopia fluorescencyjna ułatwia badanie ich lokalizacji komórkowej poprzez barwienie poszczególnych struktur z wykorzystaniem fluorochromów, wizualizację DNA np. z wykorzystaniem barwnika DAPI (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) czy aktywności promotorów lub wydajności transfekcji poprzez wykorzystanie zielonego białka fluorescencyjnego (GFP, ang. *green fluorescent protein*). Obecnie wykorzystuje się szereg metod analitycznych, które pozwalają na generowanie wielu danych w jednym eksperymencie tzw. badania przesiewowe o wysokiej przepustowości (HTS, ang. *High-throughput screening*). Szczególnie cenna jest analiza w czasie rzeczywistym, która pozwala monitorować stan komórki podczas trwania całego eksperymentu. Zaawansowane techniki obrazowania dostarczają dynamicznych informacji wizualnych na temat dynamiki komórek, morfologii, mobilności i ważnych markerów funkcjonalnych^[103]. Implementacja czujników umożliwia monitorowanie stężenia metabolitów i elektrofizjologii w czasie rzeczywistym^[104,105]. Możliwe jest również monitorowanie aktywności wewnątrzkomórkowej za pomocą metody rezonansowego transferu energii Förstera (FRET ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) i bioluminescencji^[106]. Dodatkowo sekwencjonowanie genomiczne, epigenomiczne i transkryptomiczne umożliwia poznanie genomu, zidentyfikowanie kluczowych mutacji umożliwiając kompleksowe

zrozumienie zachowania komórek w stanach chorobowych, a także ich odpowiedzi na zmiany środowiskowe lub leczenie^[107].

Trójwymiarowe hodowle komórkowe niosą ze sobą nie tylko wiele możliwości, ale także wiele wyzwań. Opracowanie prawidłowego układu do hodowli 3D jest bardzo ważnym aspektem. Zazwyczaj składa się on z wielu elementów, co powoduje ograniczenie możliwości zautomatyzowania zmiany pożywki czy podawania substancji leczniczych wydłużając czas pracy^[108]. Istotnym elementem jest również uzyskanie powtarzalności wyników i skalowalność układu, który oddaje wybraną funkcję tkanek lub narządów. Obecne stosowane metody do oceny parametrów hodowli 2D, są również często wykorzystywane w hodowlach 3D. Przykładem może być cytometria przepływowa umożliwiająca wieloparametryczną analizę pojedynczych komórek, ich cech morfologicznych, monitorowanie wielu procesów komórkowych m.in. apoptozy czy ekspresji białek^[105,109]. Analiza komórek w hodowli 3D z wykorzystaniem cytometrii przepływowej jest możliwa poprzez poeksperymentalną ekstrakcję komórek z rusztowań i sferoidów, uniemożliwiając ciągłość prowadzenia takiej hodowli^[110].

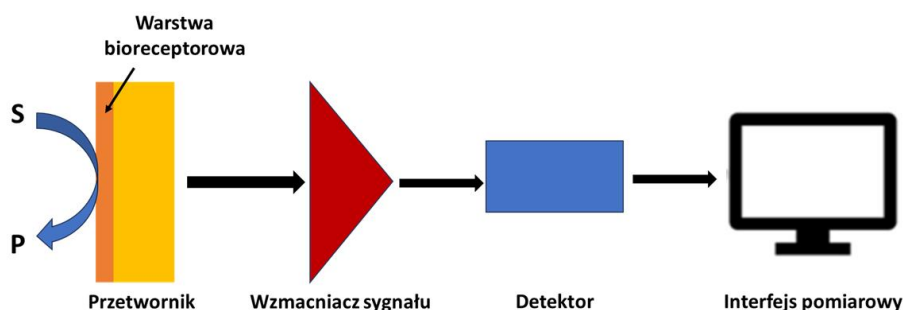
Głównym wyzwaniem dla hodowli komórek 3D jest wizualizacja tkanek i komórek w trzecim wymiarze. Mikroskopia konfokalna umożliwia skanowanie obrazów o wysokiej rozdzielczości, a następnie ich nakładanie na siebie na różnych płaszczyznach ogniskowych generując obraz 3D. Ich znaczną wadą jest ograniczona prędkość obrazowania ze względu na ich zależność od skanowania wąskiego ogniska światła. Dodatkowo nadmiar światła tła może powodować efekty fotouszkodzenia i fotowysielenia^[111]. Mikroskopia dwufotonowa i wielofotonowa również wydają się atrakcyjne głównie ze względu na ich dwukrotną głębokość penetracji w porównaniu z mikroskopią konfokalną. Wadą tych metod jest niska rozdzielczość i generowanie światła o dużym natężeniu mogącym powodować efekty fototoksyczne^[23]. Obrazowania o wysokiej rozdzielczości silnie rozpraszających próbek o dużej wysokości i złożonych strukturach geometrycznych są obecnie ograniczone przez słabą penetrację światła, rozpraszanie światła optycznego i absorpcję światła^[112]. Ponadto wykonywanie zdjęć za pomocą obiektywów o większym powiększeniu (40-60x) znacznie wydłuża czas obrazowania i ich późniejszą analizę. Utworzone pliki charakteryzują się znacznym rozmiarem^[113].

Monitorowanie parametrów metabolicznych w trójwymiarowej hodowli komórkowej może wydawać się stosunkowo łatwe, ale integracja czujników w układzie mikroprzepływowym lub w statycznych matrycach 3D często stanowi wyzwanie. Porównanie stężeń cząsteczek metabolicznych (np. glukozy) lub pH w przepływie w mikrokanale przed i za mikrokomorą hodowlaną znajdującą się w układzie

mikroprzepływowym może pokazać zmianę stężenia metabolitu lub pH w czasie^[114], jednak bezpośredni dostęp czujnika do komórki jest utrudniony ze względu na rozkład komórek w całej przestrzeni mikrokomory hodowlanej^[115] należy również wziąć pod uwagę transport bardziej złożonych substancji. W środowiskach statycznych, takich jak sferoidy lub hodowla na podłożu hydrożelowym, ze względu na dyfuzję i ograniczony transport metabolitów, zmierzone wartości nie zawsze są reprezentatywne^[115]. Ponadto wykorzystanie mikroczujników jest ograniczone tylko do wykrywania substancji pozakomórkowych. Umieszczenie czujników wewnątrz sferoidów jest istotne i może dostarczyć informacji o warunkach niedotlenienia między komórkami. Wiąże się to jednak z ryzykiem wpływu na zachowanie komórek. Odpowiednia pozycja czujników ma znaczenie dla odczytu, ponieważ wiąże się z obecnością gradientów np. tlenu lub transportem masy wewnątrz mikrokanalów lub mikrokomory.

1.5.2. Wykorzystanie czujników w ocenie aktywności metabolicznej komórek w hodowlach komórkowych

Czujnik jest definiowany jako samowystarczalne, zintegrowane urządzenie, które przekształca informacje chemiczną na użytecznie analityczny specyficzny sygnał ilościowy lub półilościowy^[116]. Może on pochodzić z reakcji chemicznej, właściwości fizycznej lub międzycząsteczkowego rozpoznawania receptora-analit w biosensorach. Czujnik chemiczny składa się z receptora i przetwornika fizykochemicznego (Rysunek 1.5.). W przypadku bioczujników, receptorem mogą być enzymy, mikroorganizmy, organelle komórkowe, receptory komórkowe, antygeny i przeciwciała, oligonukleotydy i aptamery (krótkie fragmenty DNA lub RNA)^[117]. Ze względu na rodzaj przetwornika, czujniki można podzielić na elektrochemiczne (potencjometryczne, amperometryczne, i konduktometryczne), optyczne, masowe i kalorymetryczne.



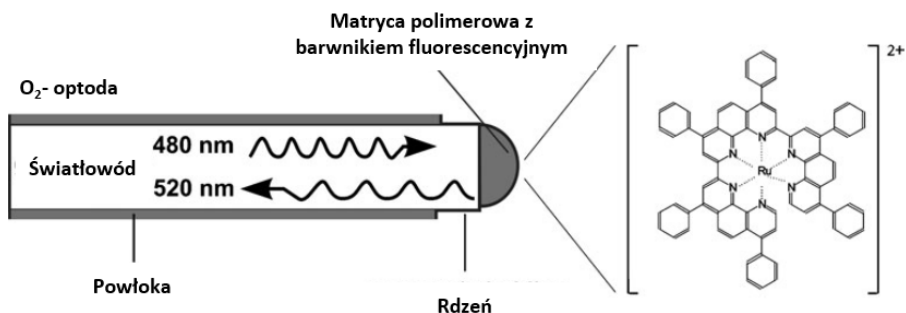
Rysunek 1.5. Zasada działania czujnika analitycznego.

1.5.3. Metody optyczne w ocenie aktywności metabolicznej komórek

Czujniki stosowane w analizie parametrów hodowli komórkowej są najczęściej oparte na detekcji optycznej lub elektrochemicznej, zapewniając wysoką czułość oraz selektywność^[118–120]. Czujniki optyczne opierają się na wykrywaniu zmian parametrów optycznych, takich jak absorpcja, luminescencja, rozpraszanie lub współczynnik załamania światła^[121]. Istotną zaletą jest nieinwazyjność pomiarów, ponieważ odczyt nie wymaga fizycznego połączenia między detektorem, a elementem czujnikowym^[119] i może być zintegrowany z przezroczystymi platformami mikroanalitycznymi lub wykorzystywany za pomocą zamkniętych płytek dołkowych i indywidualnie zaprojektowanych systemów do hodowli komórkowej o unikatowej architekturze. W przeciwieństwie do pomiarów elektrochemicznych, substancja oznaczana nie jest zużywana, dlatego jej stężenie jest stałe w czasie^[122]. Najczęściej stosowane metody optyczne opierają się na detekcji fluorescencyjnej, ze względu na niskie stężenia metabolitów lub oznaczanych markerów w środowisku hodowli komórkowej.

Bezznacznikowe systemy detekcji (ang. label-free detection) pozwalają na bezpośrednie pomiary bez konieczności modyfikacji analitu^[123]. W optodach, chemoczuwnikach optycznych, znacznik jest osadzony w matrycy na końcu czujnika^[124]. Podczas pomiaru, dioda poprzez wskaźnik oświetlony światłowodem wykrywa zmianę intensywności fotoluminescencji, absorpcji lub odbicia skorelowaną ze stężeniem analitu.

W przypadku optody wykorzystywanej do określenia zawartości tlenu w medium hodowlanym, tlen cząsteczkowy jest wykrywany poprzez wygaszanie fluorescencji, dzięki barwnikowi fluorescencyjnemu unieruchomionemu na końcu światłowodu (Rysunek 1.6.). Typowymi wskaźnikami do wykrywania tlenu są kompleksy metali, np. ruten(II) tris-4,7-difenylo-1,10-fenantroliny^[123] unieruchomiony w hydrofobowych matrycach w celu uniknięcia kompleksowania pomiędzy jonami metalu we wskaźnikach, a jonami obecnymi w próbce^[125]. Optyczne czujniki tlenu mają wysoką rozdzielczość przestrzenną i mogą być stosowane w próbkach o małych objętościach^[124]. Ze względu na efekt fotowysielania, długoterminowa stabilność jest ograniczona.



Rysunek 1.6. Zasada działania optod światłowodowych. Rysunek wykonano na podstawie^[124].

1.5.4. Metody elektrochemiczne w ocenie aktywności metabolicznej komórek

Czujniki elektrochemiczne charakteryzują się wysoką czułością i selektywnością dla różnych substancji oznaczanych^[115]. Istotną zaletą jest ich wysoka rozdzielczość czasowa i przestrzenna^[126]. Łatwa miniaturyzacja i integracja z platformą mikroprzepływową pozwalają na wykrywanie wielu substancji jednocześnie^[114,119]. Zastosowanie czujników elektrochemicznych jest ograniczone przez zużycie analitu i wymagania dotyczące oprzyrządowania elektrochemicznego^[115]. Do oceny parametrów metabolicznych stosuje się przede wszystkim czujniki oparte na potencjometrycznej i amperometrycznej metodzie detekcji, istotne jest również wykorzystanie elektrochemicznej impedancji spektroskopowej do oceny adhezji podłoża.

• Woltamperometria

Woltamperometria jest jedną z podstawowych technik elektroanalitycznych, w której natężenie prądu jest mierzone po przyłożeniu napięcia do elektrody. W rezultacie wykreślana jest krzywa zależności natężenia prądu od przyłożonego potencjału nazywana woltamperogramem (1), który jest odpowiednikiem widma uzyskanego w spektroskopii. Dostarcza jakościowych i ilościowych danych na temat elektroaktywnych cząsteczek biorących udział w reakcji utleniania lub redukcji^[127].

$$i = f(E) \quad (1)$$

Obecnie najczęściej wykorzystuje się układ pomiarowy, który składa się z trzech elektrod - elektrody pracującej (WE, ang. *working electrode*), elektrody odniesienia (RE, ang. *reference electrode*) i przeciwelektrody (CE, ang. *counter electrode*), które tworzą obwód elektryczny. Wszystkie elektrody są podłączone do potencjostatu o wysokiej impedancji wyjściowej, który pozwala na polaryzację elektrody i pomiar prądu.

Elektroda pracująca jest polaryzowalną elektrodą o niewielkiej powierzchni, na której zachodzi reakcja elektrodowa będąca podstawą pomiaru. Najczęściej wykorzystuje się elektrody wykonane z węgla (np. grafit, diament, węgiel szklisty) lub metali szlachetnych (np. złoto, platyna) w zależności od wartości standardowego potencjału reakcji utleniania/redukcji substancji oznaczanej.

Elektroda odniesienia (referencyjna) jest półogniwem o stałym i odtwarzalnym potencjale. Jest to tak zwana elektroda niepolaryzowana, czyli elektroda, której potencjał nie ulega zmianie podczas przepływu prądu. Powinna charakteryzować się również niskim potencjałem dyfuzyjnym i oporem elektrycznym. Jako elektrody odniesienia najczęściej stosuje się elektrodę kalomelową lub chlorosrebrową.

Trzecią elektrodą stosowaną w układzie pomiarowym jest przeciwelektroda, która zapewnia stały potencjał elektrody odniesienia, poprzez zapewnienie obwodu dla przepływu prądu związanego z reakcjami na elektrodzie pracującej. Najczęściej jako przeciwelektroda jest wykorzystywany drut wykonany z platyny lub grafitu o znacznie większej powierzchni niż powierzchnia elektrody pracującej.

W woltamperometrii sygnałem analitycznym jest prąd związany z redukcją lub utlenianiem oznaczanych substancji na powierzchni elektrody pracującej. Podczas reakcji chemicznej, powstaje gradient stężenia, prowadzący do przemieszczania się substratu z roztworu ogólnego w kierunku powierzchni elektrody. Powstający prąd jest znany jako prąd faradajowski (ang. *Faradaic current*), anodowy (-) lub katodowy (+). Natężenie prądu zależy nie tylko od liczby elektronów biorących udział w reakcji, ale także od rozmiaru, kształtu i materiału elektrody^[128].

Wielkość prądu zależy od szybkości reakcji utleniania lub redukcji, na którą wpływają dwa czynniki: szybkość, z jaką substraty i produkty są transportowane do i z elektrody oraz szybkość przeniesienia ładunku pomiędzy elektrodą a substratem w roztworze. Transport cząsteczek w stronę elektrody podczas reakcji jest złożoną funkcją wszystkich trzech rodzajów transportu - dyfuzji, migracji i konwekcji. W typowych warunkach pomiaru woltamperometrycznego dąży się do ograniczenia wpływu migracji poprzez dodatek elektrolitu podstawowego o wysokim stężeniu. Pomiar

zachodzi w warunkach statycznych (brak konwekcji), dlatego to wpływ dyfuzji ma największe znaczenie. Dyfuzja zachodzi, gdy stężenie cząsteczki lub jonu na powierzchni elektrody zmienia się w stosunku do roztworu ogólnego. Podczas przyłożenia potencjału stężenie substancji oznaczanej na powierzchni zmniejsza się, a jej cząsteczki dyfundują z roztworu ogólnego w kierunku elektrody. Obszar, w którym zachodzi dyfuzja, nazywany jest warstwą dyfuzyjną, a jej szerokość zwiększa się wraz z czasem przyłożonego potencjału^[129]. W ogniwie woltametrycznym mierzony jest prąd dyfuzyjny.

Drugim czynnikiem wpływającym na natężenie prądu jest szybkość ruchu elektronów między elektrodami i substancją oznaczaną. Jeśli przeniesienie ładunku na granicy faz elektroda-roztwór zachodzi znacząco szybciej niż transport substratów do elektrody, na powierzchni elektrody stężenie formy utlenionej i zredukowanej substancji elektroaktywnej będzie spełniało równanie Nernsta (2). W takim wypadku możemy mówić o reakcji odwracalnej. W przeciwnym razie gdy przeniesienie ładunku na granicy faz zachodzi znacznie wolniej, równanie Nernsta nie zostaje spełnione, a reakcja jest nieodwracalna^[128].

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{Ox}(0,t)}{c_{Red}(0,t)} \quad (2)$$

gdzie:

E - potencjał elektrody [mV],

E^0 - standardowy potencjał elektrody [mV],

R - stała gazowa [J/mol·K],

T - temperatura (K),

F - stała Faradaya [C/mol],

n - ładunek jonu,

c_{Ox} - stężenie formy utlenionej,

c_{Red} - stężenie formy zredukowanej.

Kinetyka reakcji elektrodowych jest opisana równaniem Butlera-Volmera. Definiuje ono zależność natężenia prądu od potencjału elektrody dla reakcji, która jest kontrolowana przeniesieniem ładunku na powierzchni elektrody, a nie transportem masy. Równanie Butlera-Volmera jest często nazywane równaniem fenomenologicznym, bowiem wywodzi się ono z obserwacji podobieństwa do równania Arrheniusa (3), które zakłada, że szybkość reakcji jest funkcją wykładniczą

pewnej energii aktywacji^[130]. W przypadku reakcji elektrodowych energia aktywacji przyjmuje funkcję wartości przyłożonego potencjału.

$$k = A \cdot \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right) \quad (3)$$

gdzie:

k – szybkość reakcji $[(\text{dm}^3)^{n-1}/\text{mol}^{n-1}\text{s}]$,

A - współczynnik steryczny,

E_a - energia aktywacji $[\text{kJ/mol}]$.

Miarą polaryzacji elektrody jest nadnapięcie η , które określa różnicę potencjałów pomiędzy potencjałem przykładanym do elektrody E , a potencjałem równowagowym E_0 (4):

$$\eta = E - E_0 \quad (4)$$

Dla procesu katodowego i anodowego stałe szybkości przyjmują odpowiednio wartość k_c , k_a (5, 6):

$$k_c = k_0 \cdot \exp \left[-\frac{\alpha n F}{RT} (E - E_0) \right] \quad (5)$$

$$k_a = k_0 \cdot \exp \left[\frac{(1-\alpha) n F}{RT} (E - E_0) \right] \quad (6)$$

gdzie:

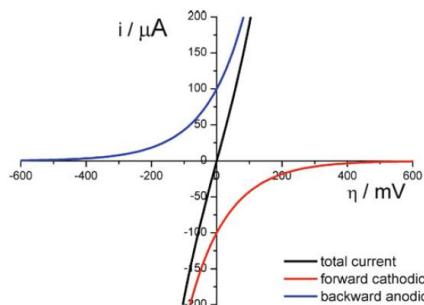
k_0 - standardowa stała szybkości reakcji $[(\text{dm}^3)^{n-1}/\text{mol}^{n-1}\text{s}]$,

α - współczynnik przeniesienia ładunku,

E - potencjał przykładany do elektrody $[\text{V}]$,

E_0 - potencjał równowagowy $[\text{V}]$.

Podczas stanu równowagi dla procesu elektrodowego zakłada się równość stężeń formy utlenionej i zredukowanej, dlatego szybkości poszczególnych składowych reakcji – utlenienia i redukcji, jak również szybkość całego procesu wyznaczana w warunkach standardowych są sobie równe. Prąd określany równaniem Butlera-Volmera jest sumą prądu katodowego i anodowego (7) – Rysunek 1.7.



Rysunek 1.7. Schemat zależności prądu całkowitego, utleniania oraz redukcji w reakcji przeniesienia jednego elektronu w równaniu Butlera – Volmera^[131].

$$i = k_0 \cdot [C_{Red}^0 \exp \left[-\frac{\alpha n F}{RT} (E - E_0) \right] - C_{Ox}^0 \exp \left[\frac{(1-\alpha) n F}{RT} (E - E_0) \right]] \quad (7)$$

gdzie:

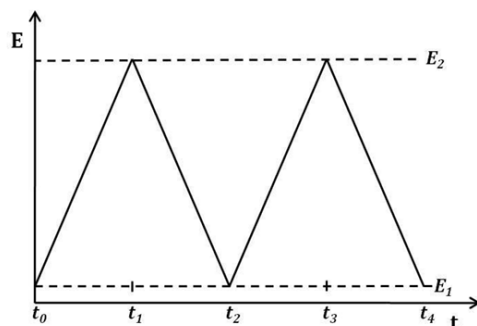
E_0 - potencjał równowagowy [V],

C_0 – stężenie reagentu na powierzchni elektrody [mol/cm³], wyznaczone z równania Nernsta-Plancka lub prawa Ficka w przypadku dyfuzji.

• Woltamperometria cykliczna

Woltamperometria cykliczna (CV, ang. *Cyclic Voltammetry*) jest jedną z powszechnych technik elektroanalitycznych w badaniach fizykochemicznych. Umożliwia szybkie uzyskanie istotnych informacji o procesie elektrodowym: kinetyce procesu (odwracalności), procesie adsorpcji na elektrodzie oraz mechanizmu reakcji. Właściwa interpretacja zmian kształtu woltamperogramu (położenia pików, ich liczby, natężenia prądu) pozwala m.in. na określenie kolejności reakcji, reaktywności powstającego produktu pośredniego czy też kinetyki reakcji chemicznej^[131].

Układ pomiarowy zazwyczaj składa się z trzech elektrod. Rejestrowane jest natężenie prądu podczas liniowej zmiany potencjału od wartości E_1 do wartości E_2 , a później z powrotem od E_2 do E_1 , ze stałą szybkością v , zwaną szybkością skanowania (Rysunek 1.8.).



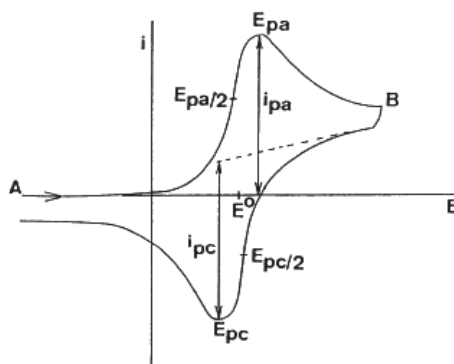
Rysunek 1.8. Zmiany potencjału w czasie t ^[132].

W przypadku reakcji odwracalnej na woltamperogramie pojawiają się dwa piki (Rysunek 1.9.): pik prądu katodowego E_{pk} – związanego z reakcją redukcji oraz pik prądu anodowego E_{pa} – związanego z reakcją utleniania, gdy produkty katodowej redukcji ulegną utlenieniu. Oba procesy zachodzą na powierzchni tej samej elektrody pracującej w ramach jednego cyklu. W procesie odwracalnym, w temperaturze 25°C, różnica między potencjałami pików wynosi (8):

$$\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} \quad (8)$$

gdzie,

n - liczba elektronów biorąca udział w reakcji.



Rysunek 1.9. Przykładowa krzywa woltamperometryczna zarejestrowana podczas pomiaru metodą woltamperometrii cyklicznej^[133]. E_{pa} – potencjał piku prądu anodowego, E_{pc} – potencjał piku prądu katodowego, i_{pa} – szczytowy prąd anodowy, i_{pc} – szczytowy prąd katodowy, E^0 – potencjał redukcji formalnej, A – początek cyklu potencjału, B – punkt, w którym cykl potencjału ulega odwróceniu.

Natężenie prądu dla procesów odwracalnych w maksimum (ekstremum) jest określony równaniem Randlesa-Sevcika (9):

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_A \quad (9)$$

gdzie:

n – liczba elektronów,

A – powierzchnia elektrody pracującej [cm^2],

D – współczynnik dyfuzji depolaryzatora [cm^2/s],

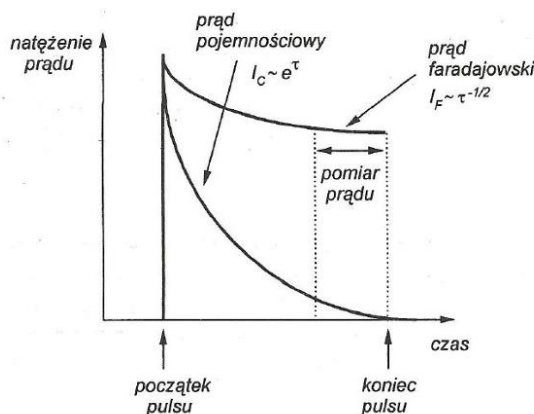
v – szybkość zmiany potencjału [V/s],

C – stężenie depolaryzatora [mol/cm^3].

• Techniki pulsowe

Różnicowa woltamperometria pulsowa (DPV, ang. *Differential Pulse Voltammetry*) oraz woltamperometria fali prostokątnej (SWV, ang. *Square Wave Voltammetry*) to dwie najpopularniejsze techniki pulsowe wykorzystywane w analizie chemicznej. Umożliwiają one rozróżnienie prądu faradajowskiego, związanego z reakcją zachodzącą na elektrodzie, od prądu pojemnościowego, który powstaje w wyniku ładowania podwójnej warstwy elektrycznej na granicy faz elektroda/elektrolit w roztworach o niskim stężeniu depolaryzatora. Obie techniki wyróżnia szybkość, precyzja i duża czułość pomiaru, które pozwalają na oznaczanie śladowych ilości substancji^[127].

Przy skokowej zmianie potencjału, wartości obu prądów wzrastają, jednak prąd faradajowski maleje znacznie wolniej od prądu pojemnościowego, co pozwala na rozróżnienie obu prądów (Rysunek 1.10.). Prąd pojemnościowy jest proporcjonalny do wielkości przyłożonego potencjału i maleje wykładniczo w czasie, natomiast prąd faradajowski maleje z pierwiastkiem kwadratowym z czasu^[133].



Rysunek 1.10. Spadek prądu faradajowskiego (I_F) i prądu pojemnościowego (I_C) wraz z upływem czasu od nałożenia pulsu^[127].

Technika DPV pierwotnie została opracowana jako metoda pomiaru z wykorzystaniem kroplowej elektrody rtęciowej, w której jeden puls przypadał na przepływ jednej kropli^[127]. W DPV na liniową zmianę potencjału nakładana jest modulacja pulsowa o stałej wysokości 10-100 mV, a prąd mierzony jest dwukrotnie na początku $i(\tau)$ i na końcu pulsu $i(\tau_1)$. Różnica natężenia prądu wynosi (10):

$$\delta i = i(\tau) - i(\tau_1) \quad (10)$$

Wysokość piku jest proporcjonalna do stężenia oznaczanej substancji (11):

$$(\delta I)_{max} = \frac{nFAD_{Red}^{1/2}C_{Red}^*}{\pi^{1/2}(\tau - \tau')^{1/2}} \varphi p \quad (11)$$

gdzie:

n - liczba elektronów,

F - stała Faradaya [C/mol]

A - powierzchnia elektrody pracującej [cm²],

D_{Red} - współczynnik dyfuzji depolaryzatora [cm²/s],

C_{Red} - stężenie depolaryzatora [mol/cm³],

φ_p - bezwymiarowy parametr związany z napięciem, który jest obliczany za pomocą technik komputerowych.

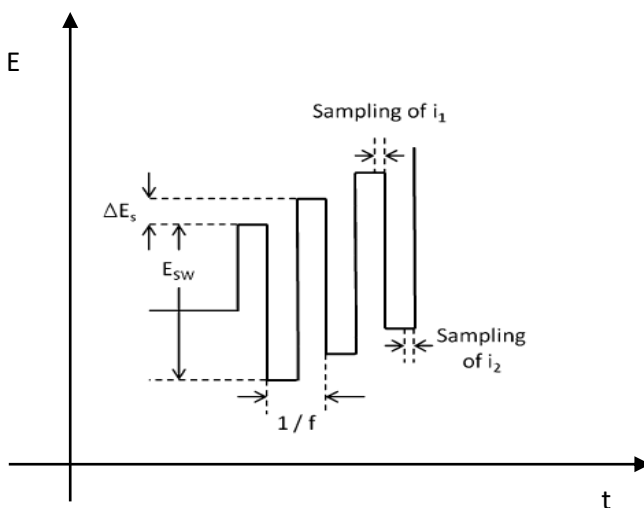
W SVW modulacja pulsowa jest nakładana na schodkowo zmieniający się potencjał (Rysunek 1.11). Podobnie jak w DPV natężenie prądu mierzone jest dwukrotnie na początku pulsu pierwotnego (dodatniego) i na końcu pulsu powrotnego (ujemnego). W przypadku reakcji odwracalnej, puls powrotny powoduje odwrotną reakcję produktu pulsu pierwotnego, czyli ponowne utlenienie produktu powstałego podczas pulsu dodatniego, powodując przepływ prądu. Natężenie prądu piku jest proporcjonalne do stężenia substancji oznaczanej (12):

$$\Delta I = \frac{nFAD_{Red}^{1/2}C_{Red}^*}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}}\Delta\varphi_p \quad (12)$$

gdzie:

t_p – szerokość pulsu

$\Delta\psi_p$ - bezwymiarowy parametr związany z napięciem, który jest obliczany za pomocą technik komputerowych.



Rysunek 1.11. Schemat zmian potencjału w woltamperometrii fali prostokątnej^[131]. ΔE_s - różnica potencjałów między dwoma kolejnymi stopniami schodów, E_{sw} - amplituda fali prostokątnej, f - częstotliwość.

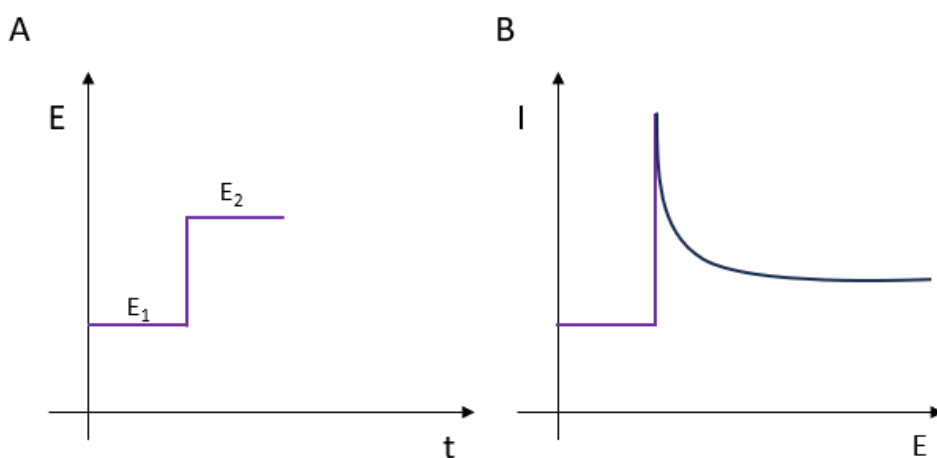
• Chronoamperometria

Chronoamperometria jest techniką potencjostatyczną, w której potencjał elektrody pracującej jest ustalony na stałym poziomie (13), w efekcie dostajemy wykres zależności prądu reakcji elektrodowej od czasu (14)^[134].

$$E = \text{const} \quad (13)$$

$$I = I(t) \quad (14)$$

Elektroda jest polaryzowana od potencjału E_1 , w którym nie zachodzi utlenianie lub redukcja elektroaktywnych cząsteczek, do potencjału E_2 gdzie rejestrowany prąd jest związany z reakcją elektrodową. Przepływ prądu jest wtedy zgodny z równaniem Cottrella (15). Natężenie prądu maleje wykładniczo wraz z upływem czasu, ze względu na zmniejszenie gradientu stężenia substratów przy powierzchni elektrody – Rysunek 1.12.^[135]



Rysunek 1.12. Schemat zmiany potencjału przykładanego do elektrody pracującej (A). Przykładowa krzywa chronoamperometryczna (B).

Kształt krzywej dla wysokich nadpotencjałów określany jest przez zależność:

$$I(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (15)$$

gdzie:

n - liczba przeniesionych elektronów,

F - stała Faradaya [C/mol].

A - powierzchnia elektrody pracującej [cm²],

C - stężenie [mol/cm³],

D - współczynnik dyfuzji [cm²/s],

t - czas [s].

• Potencjometria

Potencjometria należy do najstarszych technik instrumentalnych. W tej technice wykorzystywana jest zależność pomiędzy aktywnością oznaczanego jonu, a potencjałem elektrody. W trakcie pomiaru rejestrowana jest różnica potencjału elektrycznego pomiędzy dwoma elektrodami - elektrodą pracującą i elektrodą odniesienia przy bardzo małym przepływie prądu (warunki bezprądowe)^[136], które są podłączone do interfejsu pomiarowego o wysokiej impedancji wejściowej^[137]. W analizie potencjometrycznej różnica potencjałów między potencjałem elektrody, a aktywnością oznaczanego jonu jest opisana równaniem Nernsta (16)^[138]:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \log (a_i) \quad (16)$$

gdzie:

E - potencjał elektrody [mV],

E^0 - standardowy potencjał elektrody [mV],

R - stała gazowa [J/mol·K],

T - temperatura (K),

F - stała Faradaya [C/mol],

z - ładunek mierzonego jonu,

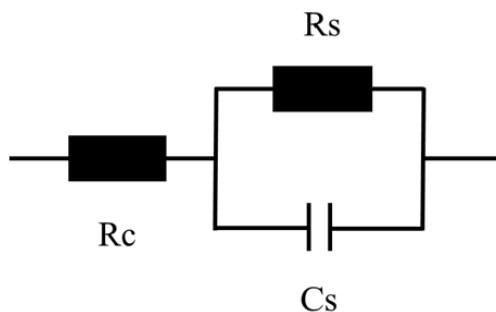
a_i - aktywność mierzonego jonu.

W analizie aktywności metabolicznej hodowli komórkowych stosuje się przede wszystkim potencjometryczne czujniki pH^[120] oparte na tlenkach metali, takich jak tlenek irydu^[120,139–141] lub tlenek rutenu^[142–144].

• Elektrochemiczna impedancja spektroskopowa

Elektrochemiczna impedancja spektroskopowa (EIS, *ang. Electrochemical impedance spectroscopy*) jest techniką elektrochemiczną, wykorzystywaną do charakteryzacji powierzchni próbki, procesów elektrodowych czy powierzchni międzyfazowych^[145,146]. Jest to metoda o wysokiej czułości, pozwalająca na wyznaczenie oporu przeniesienia ładunku i pojemności podwójnej warstwy elektrycznej^[134]. W hodowli komórkowej elektrochemiczna impedancja spektroskopowa jest wykorzystywana do analizy proliferacji, mikroruchu komórek czy apoptozy^[147].

Impedancja procesu faradajowskiego, jest często przedstawiana jako szeregowe połączenie o oporności zastępczej R_s i pojemności zastępczej C_s - Rysunek 1.13. ^[148].



Rysunek 1.13. Schematyczne przedstawienie obwodu zastępczego EIS. R_c - oporność całkowita, R_s - oporność zastępcza, C_s - pojemności zastępcza.

Pojemność elektryczna charakteryzuje zdolność kondensatora do gromadzenia ładunku. W przypadku podłączenia napięcia stałego kondensator jest ładowany do momentu osiągnięcia napięcia źródła. W przypadku prądu zmiennego kondensator ładuje się i rozładowuje się cyklicznie z tą samą częstotliwością. Zmiany impedancji wynikają m.in. z adsorpcji produktów na elektrodzie, dyfuzji depolaryzatora w pobliżu elektrod (tzw. impedancja Warburga) lub impedancji przeniesienia ładunku^[134]. Zgodnie z prawem Ohma dla prądu stałego natężenie prądu I jest proporcjonalne do jego napięcia U . W przypadku prądu zmiennego impedancja Z wyraża zależność pomiędzy przyłożonym napięciem E , a natężeniem prądu I (17):

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} \quad (17)$$

Gdy do elektrody zostanie przyłożony prąd zmienny o małej amplitudzie (18):

$$E_t = E_0 \sin(\omega t) \quad (18)$$

otrzymany sygnał będzie miał postać (19):

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (19)$$

dla (20):

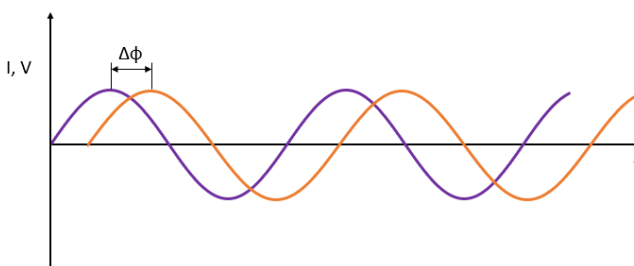
$$\omega = 2\pi f \quad (20)$$

gdzie:

ω - zmienność kąтова,

φ – kąt fazowy.

Graficzną reprezentacją fluktuacji napięcia przemiennego jest funkcja sinusoidalna (Rysunek 1.14.). W przypadku idealnego rezystora prąd i napięcie oscylują w fazie (dla $\varphi = 0$), i napięcie i prąd osiągają maksimum w tym samym momencie. W przypadku kondensatora napięcie i prąd oscylują przesunięte w fazie (dla $\varphi = 90^\circ$).



Rysunek 1.14. Schematyczne przedstawienie fluktuacji napięcia przemiennego w fazie.

Otrzymana impedancja będzie wyrażać się wzorem (21):

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t - \varphi)} \quad (21)$$

Korzystając ze wzoru Eulera, impedancja może być przedstawiona jako liczba zespolona (22):

$$Z(\omega) = Z_0(e)^{j\varphi} \cdot e^{j\omega t} \quad (22)$$

Można ją przedstawić w postaci wektorowej (23):

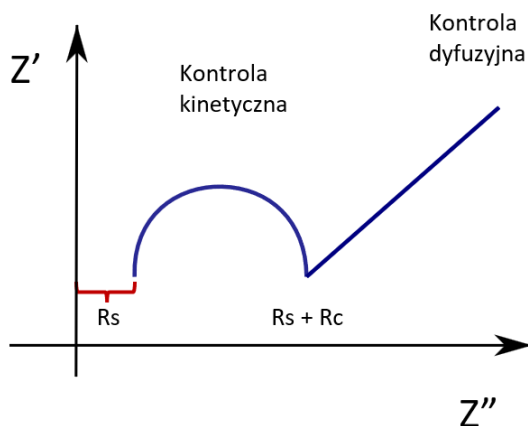
$$Z = Z' - jZ'' \quad (23)$$

gdzie (24):

$$j = \sqrt{-1} \quad (24)$$

Jedną z możliwości przedstawienia wyników pomiaru EIS jest wykres Nyquista (Rysunek 1.15.). Jest to krzywa w zależności (25):

$$Z_{Im} = f(Z_{Re}) \quad (25)$$



Rysunek 1.15. Wykres Nyquista dla układu elektrochemicznego.

Typowy układ pomiarowy do pomiaru impedancji składa się z trzech elektrod – elektrody pracującej, odniesienia oraz przeciwelektrody. W trakcie pomiaru przykładane jest stałe napięcie na które jest nakładane napięcie sinusoidalne o małej amplitudzie w wybranych zakresach częstotliwości.

1.6. Literatura:

1. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier; 2017:151-172.
2. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*. 2017;16(2):99-117.
3. Jacoby F., Darke S. J. Animal tissue culture with a synthetic medium. *Nature*. 1948;(161):768-769.
4. Parker RC. *Methods of Tissue Culture*. Rockefeller Institute for Medical Research P.B. Hoeber, Incorporated, 1938; 1938.
5. Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, Jackson CM. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat Rec*. 1907;1(5):116-128.
6. Landecker H. New times for biology: nerve cultures and the advent of cellular life in vitro. *Stud Hist Philos Sci Part C Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*. 2002;33(4):667-694.
7. Roux W. In: *Beitrage Zur Entwicklungsmechanik Des Embryo. Beitrag II. Ueber Die Entwicklung Der Froscheier Bei Aufhebung Der Richtenden Wirkung Der Schwere* (1884), Reprinted in Wilhelm Roux, *Gesammelte Abhandlungen Entwicklungsmechanik Der Organismen*. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1895. Vol II. 1884:256-276.
8. Carrel A. A method for the physiological study of tissues in vitro. *J Exp Med*. 1923;38(4):407-418.
9. Jedrzejczak-Silicka M. History of Cell Culture. In: Gowder SJT, ed. *New Insights into Cell Culture Technology*. InTech; 2017.
10. Richter M, Piwocka O, Musielak M, Piotrowski I, Suchorska WM, Trzeciak T. From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:711381.
11. Klingelhutz AJ. The roles of telomeres and telomerase in cellular immortalization and the development of cancer. *Anticancer Res*. 1999;(19):4823-4830.
12. De Bardet JC, Cardentey CR, González BL, et al. Cell Immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. *BioTech*. 2023;12(1):14.
13. Deurholt T, Van Til NP, Chhatta AA, et al. Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes. *BMC Biotechnol*. 2009;9(1):89.
14. Ramboer E, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M. Immortalized Human Hepatic Cell Lines for In Vitro Testing and Research Purposes. In: Vinken M, Rogiers V, eds. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. Vol 1250. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2015:53-76.
15. McLean JS. Immortalization Strategies for Mammalian Cells. In: *Animal Cell Biotechnology*. Vol 8. Humana Press; 1999:61-72.
16. Bodek G, Blitek A, Kowalczyk AE, Kiewisz J, Zięcik AJ. Metody immortalizacji komórek i ich zastosowanie w badaniach nad rozrodem*).
17. Zhao C. Cell culture: *in vitro* model system and a promising path to *in vivo* applications. *J Histotechnol*. 2023;46(1):1-4.

18. Dulak J. Komórki macierzyste: zastosowania, perspektywy, nieporozumienia. *Nauka*. Published online February 19, 2020;99-123.
19. Soares CP, Midlej V, Oliveira MEW de, Benchimol M, Costa ML, Mermelstein C. 2D and 3D-Organized Cardiac Cells Shows Differences in Cellular Morphology, Adhesion Junctions, Presence of Myofibrils and Protein Expression. Cordes N, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e38147.
20. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26.
21. Costa EC, De Melo-Diogo D, Moreira AF, Carvalho MP, Correia IJ. Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnol J*. 2018;13(1):1700417.
22. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. Published online 2016.
23. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):839-845.
24. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*. Published online January 1, 2012;jcs.079509.
25. Hickman JA, Graeser R, De Hoogt R, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J*. 2014;9(9):1115-1128.
26. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):753-762.
27. Salinas-Vera YM, Valdés J, Pérez-Navarro Y, et al. Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. *Front Oncol*. 2022;12:826113.
28. Costa EC, Moreira AF, De Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv*. 2016;34(8):1427-1441.
29. Mseka T, Bamburg JR, Cramer LP. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. *J Cell Sci*. 2007;120(24):4332-4344.
30. Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J*. 2006;20(7):811-827.
31. Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J*. 2007;93(12):4453-4461.
32. Walpita D, Hay E. Studying actin-dependent processes in tissue culture. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(2):137-141.
33. Meshel AS, Wei Q, Adelstein RS, Sheetz MP. Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2005;7(2):157-164.
34. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro—A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(5):405-412.

35. Fuchs, E., Tumber T., Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004;116(6).
36. Li C, Kato M, Shiue L, Shively JE, Ares M, Lin RJ. Cell type and culture condition–dependent alternative splicing in human breast cancer cells revealed by splicing-sensitive microarrays. *Cancer Res*. 2006;66(4):1990-1999.
37. Gomez-Lechon MJ, Jover R, Donato T, et al. Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *J Cell Physiol*. 1998;177(4):553-562.
38. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):675-688.
39. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signalling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22(1):287-309.
40. Cushing MC, Anseth KS. Hydrogel cell cultures. *Science*. 2007;316(5828):1133-1134.
41. Farrell E, Byrne EM, Fischer J, et al. A comparison of the osteogenic potential of adult rat mesenchymal stem cells cultured in 2-D and on 3-D collagen glycosaminoglycan scaffolds. Lee TC, O'Brien FJ, eds. *Technol Health Care*. 2006;15(1):19-31.
42. Alberts B et al. Tkanki i nowotwory. In: *Podstawy Biologii Komórki*. Vol II. II. Wydawnictwo Naukowe PWN; 2009:697-740.
43. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601-610.
44. Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJP, Cukierman E. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol*. 2005;167(2):475-488.
45. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 2003;13(5):264-269.
46. Frieboes HB, Zheng X, Sun CH, Tromberg B, Gatenby R, Cristini V. An Integrated Computational/Experimental Model of Tumor Invasion. *Cancer Res*. 2006;66(3):1597-1604.
47. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-249.
48. Dhaliwal A. Three Dimensional Cell Culture : A Review. *Mater Methods*. 2012;2.
49. Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*. 2018;9:6.
50. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801.
51. Haisler WL, Timm DM, Gage JA, Tseng H, Killian TC, Souza GR. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc*. 2013;8(10):1940-1949.
52. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep*. 2015;33(4):1837-1843.

53. Tunggal JK, Cowan DSM, Shaikh H, Tannock IF. Penetration of Anticancer Drugs through Solid Tissue: A Factor That Limits the Effectiveness of Chemotherapy for Solid Tumors.
54. Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, et al. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res.* 2014;323(1):131-143.
55. Ohmori T, Yang JL, Price JO, Arteaga CL. Blockade of Tumor Cell Transforming Growth Factor- β s Enhances Cell Cycle Progression and Sensitizes Human Breast Carcinoma Cells to Cytotoxic Chemotherapy. *Exp Cell Res.* 1998;245(2):350-359.
56. Park SY, Hong HJ, Lee HJ. Fabrication of Cell Spheroids for 3D Cell Culture and Biomedical Applications. *BioChip J.* 2023;17(1):24-43.
57. Kitel R, Czarnecka J, Rusin A. Trójwymiarowe hodowle komórek — zastosowania w badaniach podstawowych i inżynierii tkankowej. *Postępy Biochemii.* 2013;59(3):305-314.
58. Sutherland Robert M. Growth of Multicell Spheroids in Tissue Culture as a Model of Nodular Carcinomas2. *JNCI J Natl Cancer Inst.* Published online January 1971.
59. Jeong Y, Tin A, Irudayaraj J. Flipped Well-Plate Hanging-Drop Technique for Growing Three-Dimensional Tumors. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:898699.
60. Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nat Protoc.* 2013;8(7):1391-1415.
61. Valdoz JC, Johnson BC, Jacobs DJ, et al. The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12690.
62. Salmenperä P, Karhemo PR, Räsänen K, Laakkonen P, Vaheri A. Fibroblast spheroids as a model to study sustained fibroblast quiescence and their crosstalk with tumor cells. *Exp Cell Res.* 2016;345(1):17-24.
63. Brown Y, Hua S, Tanwar PS. Extracellular matrix in high-grade serous ovarian cancer: Advances in understanding of carcinogenesis and cancer biology. *Matrix Biol.* 2023;118:16-46.
64. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(24):4195-4200.
65. Hanitrarimalala V, Prgomet Z, Hedhammar M, Tassidis H, Wingren AG. In vitro 3D modeling of colorectal cancer: the pivotal role of the extracellular matrix, stroma and immune modulation. *Front Genet.* 2025;16:1545017.
66. Deng B, Zhao Z, Kong W, Han C, Shen X, Zhou C. Biological role of matrix stiffness in tumor growth and treatment. *J Transl Med.* 2022;20(1):540.
67. Wang C, Sinha S, Jiang X, et al. Matrix Stiffness Modulates Patient-Derived Glioblastoma Cell Fates in Three-Dimensional Hydrogels. *Tissue Eng Part A.* 2021;27(5-6):390-401.
68. Shen Y, Wang X, Lu J, et al. Reduction of Liver Metastasis Stiffness Improves Response to Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell.* 2020;37(6):800-817.e7.

69. Holle AW, Young JL, Spatz JP. In vitro cancer cell–ECM interactions inform in vivo cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:270-279.
70. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(5):526-532.
71. Kruk A, Gadomska-Gajadhu A, Sebai A, Ruśkowski P. Rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej. *Wyroby Medyczne.* 2017;(4):31-35.
72. Astashkina A, Grainger DW. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;69-70:1-18.
73. Evangelatov A, Pankov R. The Evolution of Three-Dimensional Cell Cultures Towards Unimpeded Regenerative Medicine and Tissue Engineering. In: Andrades JA, ed. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering.* InTech; 2013.
74. Tomecka E, Tokarska K, Jastrzębska E, Chudy M, Brzózka Z. Inżynieria komórkowa w systemach Lab-on-a-chip Cell engineering in Lab-on-a-chip systems. *Wiadomości chemiczne.* 2015;(69):9-10.
75. Thiele J, Ma Y, Bruekers SMC, Ma S, Huck WTS. 25th Anniversary Article: Designer Hydrogels for Cell Cultures: A Materials Selection Guide. *Adv Mater.* 2014;26(1):125-148.
76. Ho TC, Chang CC, Chan HP, et al. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules.* 2022;27(9):2902.
77. Lou J, Mooney DJ. Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture. *Nat Rev Chem.* 2022;6(10):726-744.
78. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS.* 2010;10(9):1886-1890.
79. Duval K, Grover H, Han LH, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology.* 2017;32(4):266-277.
80. Jorgensen C, Simon M. In Vitro Human Joint Models Combining Advanced 3D Cell Culture and Cutting-Edge 3D Bioprinting Technologies. *Cells.* 2021;10(3):596.
81. Kim GJ, Kim L, Kwon OS. Application of 3D Bioprinting Technology for Tissue Regeneration, Drug Evaluation, and Drug Delivery. *Appl Sci Converg Technol.* 2023;32(1):1-6.
82. Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4(1):261-286.
83. Young EWK, Beebe DJ. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem Soc Rev.* 2010;39(3):1036.
84. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Cell Culture in 3-Dimensional Microfluidic Structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomed Microdevices.* 2003;5(2):109-114.
85. Theriault D, White SR, Lewis JA. Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly. *Nat Mater.* 2003;2(4):265-271.
86. Tkachenko E, Gutierrez E, Ginsberg MH, Groisman A. An easy to assemble microfluidic perfusion device with a magnetic clamp. *Lab Chip.* 2009;9(8):1085.

87. Sokolowska P, Zukowski K, Janikiewicz J, Jastrzebska E, Dobrzyn A, Brzozka Z. Islet-on-a-chip: Biomimetic micropillar-based microfluidic system for three-dimensional pancreatic islet cell culture. *Biosens Bioelectron.* 2021;183:113215.
88. Bamorovat Abadi G, Bahrami M. The effect of surface roughness on capillary rise in micro-grooves. *Sci Rep.* 2022;12(1):14867.
89. Low LA, Mummery C, Berridge BR, Austin CP, Tagle DA. Organs-on-chips: into the next decade. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(5):345-361.
90. Vunjak-Novakovic G, Ronaldson-Bouchard K, Radisic M. Organs-on-a-chip models for biological research. *Cell.* 2021;184(18):4597-4611.
91. Verstegen MMA, Coppes RP, Beghin A, et al. Clinical applications of human organoids. *Nat Med.* 2025;31(2):409-421.
92. Yang L, Yang S, Li X, et al. Tumor organoids: From inception to future in cancer research. *Cancer Lett.* 2019;454:120-133.
93. Bas A, Burns N, Gulotta A, et al. Understanding the Development, Standardization, and Validation Process of Alternative In Vitro Test Methods for Regulatory Approval from a Researcher Perspective. *Small.* 2021;17(15):2006027.
94. Mottet G, Grassart A, Barthélemy P, et al. Organoids, organs-on-chips, complex in vitro model: Definitions, applications, validation, ethics. *Therapies.* 2025;80(1):17-31.
95. Lee SY, Lee DY, Kang JH, et al. Alternative experimental approaches to reduce animal use in biomedical studies. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2022;68:103131.
96. COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT. Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2022. Published online July 19, 2024. Accessed July 19, 2024. <https://circabc.europa.eu/ui/group/8ee3c69a-bccb-4f22-89ca-277e35de7c63/library/051e5787-7746-46cf-8a0d-310f84fd1900/details>
97. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.*; 1959.
98. Neuhaus W, Reininger-Gutmann B, Rinner B, et al. The Rise of Three Rs Centres and Platforms in Europe*. *Altern Lab Anim.* 2022;50(2):90-120.
99. Arck PC. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. *J Reprod Immunol.* 2019;132:54-59.
100. The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations. EFPIA Recommendations on Phasing Out Animal Testing for Chemical Safety Assessments. Published online June 2025. <https://www.efpia.eu/media/meef32ki/efpia-recommendations-on-phasing-out-animal-testing-for-chemical-safety-assessments.pdf>
101. Edwards M, Blanquie O, Ehmann F. Insights into new approach methodology innovation: an EMA perspective. *Nat Rev Drug Discov.* 2025;24(5):325-326.
102. Heads on! Designing a Qualification Framework for Organ-on-Chip. *ALTEX.* Published online 2024.
103. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010;328(5986):1662-1668.

104. Shin H, Jeong S, Lee JH, Sun W, Choi N, Cho IJ. 3D high-density microelectrode array with optical stimulation and drug delivery for investigating neural circuit dynamics. *Nat Commun.* 2021;12(1):492.
105. Shin Y, Han S, Jeon JS, et al. Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat Protoc.* 2012;7(7):1247-1259.
106. Liu L, He F, Yu Y, Wang Y. Application of FRET Biosensors in Mechanobiology and Mechanopharmacological Screening. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:595497.
107. Kelsey G, Stegle O, Reik W. Single-cell epigenomics: Recording the past and predicting the future. *Science.* 2017;358(6359):69-75.
108. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):5517-5527.
109. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology.* 2012;64(2):109-130.
110. Gong Y, Fan N, Yang X, Peng B, Jiang H. New advances in microfluidic flow cytometry. *ELECTROPHORESIS.* 2019;40(8):1212-1229.
111. Pawley, J. B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* III. Springer; 2006.
112. Hsieh HC, Han Q, Brenes D, et al. Imaging 3D cell cultures with optical microscopy. *Nat Methods.* 2025;22(6):1167-1190.
113. Booij TH, Price LS, Danen EHJ. 3D Cell-Based Assays for Drug Screens: Challenges in Imaging, Image Analysis, and High-Content Analysis. *SLAS Discov.* 2019;24(6):615-627.
114. Weltin A, Slotwinski K, Kieninger J, et al. Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. *Lab Chip.* 2014;14(1):138-146.
115. Dornhof J, Kieninger J, Rupitsch SJ, Weltin A. Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip (2019–2024). *Lab Chip.* 2025;25(5):1149-1168.
116. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification | International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(1-2):121-131.
117. El Harrad L, Bourais I, Mohammadi H, Amine A. Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Enzyme Inhibition for Clinical and Pharmaceutical Applications. *Sensors.* 2018;18(1):164.
118. Rivas L, Dulay S, Miserere S, et al. Micro-needle implantable electrochemical oxygen sensor: ex-vivo and in-vivo studies. *Biosens Bioelectron.* 2020;153:112028.
119. Tawade P, Mastrangeli M. Integrated Electrochemical and Optical Biosensing in Organs-on-Chip. *ChemBioChem.* 2024;25(3):e202300560.
120. Kieninger J, Weltin A, Flamm H, Urban GA. Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip. *Lab Chip.* 2018;18(9):1274-1291.

121. Hulanicki A, Glab S, Ingman F. Chemical Sensors Definitions and Classification. *Pure APPLCem.* 1991;(69):1247-1250.
122. Reyes SJ, Durocher Y, Pham PL, Henry O. Modern Sensor Tools and Techniques for Monitoring, Controlling, and Improving Cell Culture Processes. *Processes.* 2022;10(2):189.
123. Wolfbeis OS. Materials for fluorescence-based optical chemical sensors. *J Mater Chem.* 2005;15(27-28):2657.
124. Glindkamp A, Riechers D, Rehbock C, Hitzmann B, Scheper T, Reardon KF. Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends. In: Eibl R, Eibl D, eds. *Disposable Bioreactors.* Vol 115. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg; 2009:145-169.
125. Surribas A, Geissler D, Gierse A, et al. State variables monitoring by in situ multi-wavelength fluorescence spectroscopy in heterologous protein production by *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 2006;124(2):412-419.
126. Oliveira M, Conceição P, Kant K, Ainla A, Diéguez L. Electrochemical sensing in 3D cell culture models: new tools for developing better cancer diagnostics and treatments. *Cancers.* 2021;13(6):1381.
127. Szczepaniak W. *Metody Instrumentalne w Analizie Chemicznej.* 5th ed. PWN; 2005.
128. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.* II. Wiley; 2001.
129. David Harvey. Electrochemical Methods. In: *Analytical Chemistry 2.1.* 2016:637-746.
130. Dickinson EJJ, Wain AJ. The Butler-Volmer equation in electrochemical theory: Origins, value, and practical application. *J Electroanal Chem.* 2020;872:114145.
131. Moretto LM, Kalcher K, eds. *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors: Fundamentals.* Springer New York; 2014.
132. Stojek Z. Pulse Voltammetry. In: Scholz F, Bond AM, Compton RG, et al., eds. *Electroanalytical Methods.* Springer Berlin Heidelberg; 2010:107-119.
133. Edmonds TE. Voltammetric and amperometric transducers. In: Edmonds TE, ed. *Chemical Sensors.* Springer Netherlands; 1988:193-213.
134. Kiszka A. *Elektrochemia II Elektrodyka.* 1st ed. WNT; 2001.
135. Kreysa G, Ota KI, Savinell RF, eds. *Encyclopedia of Applied Electrochemistry.* Springer New York; 2014.
136. Janata J. Potentiometric Sensors. In: *Principles of Chemical Sensors.* Springer US; 2009:119-199.
137. Göpel W, Hesse J, Zemel JN, eds. *Sensors: Chemical and Biochemical Sensors - Part I.* 1st ed. Wiley; 1991.
138. Bakker E, Pretsch E, Bühlmann P. Selectivity of Potentiometric Ion Sensors. *Anal Chem.* 2000;72(6):1127-1133.
139. Olthuis W, Robben MAM, Bergveld P, Bos M, Van Der Linden WE. pH sensor properties of electrochemically grown iridium oxide. *Sens Actuators B Chem.* 1990;2(4):247-256.

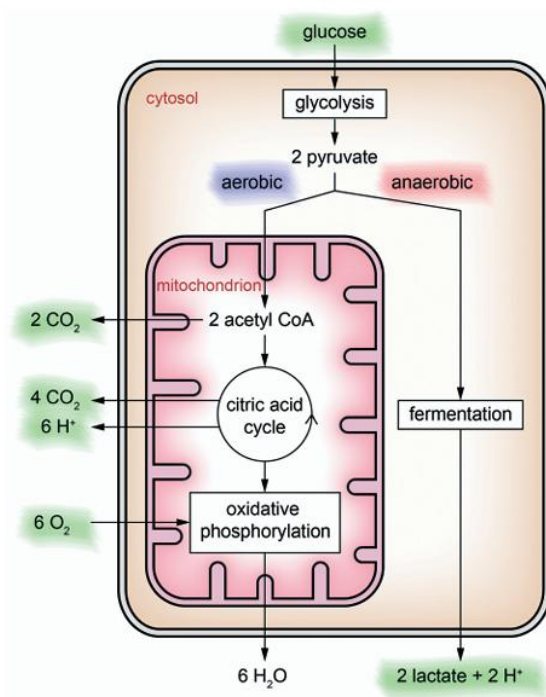
140. Marzouk SAM. Improved Electrodeposited Iridium Oxide pH Sensor Fabricated on Etched Titanium Substrates. *Anal Chem.* 2003;75(6):1258-1266.
141. Kim TY, Yang S. Fabrication method and characterization of electrodeposited and heat-treated iridium oxide films for pH sensing. *Sens Actuators B Chem.* 2014;196:31-38.
142. Sardarinejad A, Maurya DK, Alameh K. The effects of sensing electrode thickness on ruthenium oxide thin-film pH sensor. *Sens Actuators Phys.* 2014;214:15-19.
143. Tanumihardja E, Slaats RH, Van Der Meer AD, Passier R, Olthuis W, Van Den Berg A. Measuring Both pH and O₂ with a Single On-Chip Sensor in Cultures of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to Track Induced Changes in Cellular Metabolism. *ACS Sens.* 2021;6(1):267-274.
144. Tanumihardja E, Paradelo Rodríguez A, Loessberg-Zahl JT, Mei B, Olthuis W, Van Den Berg A. On-chip electrocatalytic NO sensing using ruthenium oxide nanorods. *Sens Actuators B Chem.* 2021;334:129631.
145. Prokopowicz A. Impedance study of hydrogen evolution from solid tetrabutylammonium hydroxide hydrate. *Solid State Ion.* 2003;157(1-4):209-213.
146. Raila T, Ambrulevičius F, Penkauskas T, et al. Clusters of protein pores in phospholipid bilayer membranes can be identified and characterized by electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta.* 2020;364:137179.
147. Voiculescu I, Li F, Nordin AN. Impedance Spectroscopy of Adherent Mammalian Cell Culture for Biochemical Applications: A Review. *IEEE Sens J.* 2021;21(5):5612-5627.
148. Lazanas ACh, Prodromidis MI. Electrochemical impedance spectroscopy—A tutorial. *ACS Meas Sci Au.* 2023;3(3):162-193.

2. Opracowanie macierzy elektrodowej do hodowli komórkowej

2.1. Wprowadzenie

Monitorowanie metabolizmu w hodowlach komórkowych koncentruje się na katabolicznym szlaku glukozy, która jest głównym źródłem energii dla aktywności komórkowej^[1]. Zostało to przedstawione w dużym uproszczeniu na Rysunku 2.1., gdzie glukoza jest jedynym składnikiem odżywczym dostarczanym w pożywce hodowlanej. Szlak metaboliczny glukozy jest warunkowany dostępem tlenu w hodowli, dlatego istotna jest znajomość i monitorowanie warunków tlenowych w hodowli komórkowej.

Czujniki wykorzystywane w hodowlach komórkowych *in vitro* pozwalają jedynie na monitorowanie parametrów zewnątrzkomórkowych. Zastosowanie bioczujników glukozy, mleczanów, oraz czujników pH i tlenu pozwala ocenić wzrost komórek, a także wpływ podawanych ksenobiotyków na ich żywotność.



Rysunek 2.1. Schemat rozkładu glukozy na drodze tlenowej oraz beztlenowej w komórkach zwierzęcych^[1].

Pierwszym etapem rozkładu glukozy jest glikoliza, która zachodzi w cytozolu. Glukoza jest rozkładana na cząsteczki pirogronianu, następnie w warunkach tlenowych, pirogronian jest przekształcany w mitochondrium do acetylokoenzymu A, który wchodząc w cykl Krebsa przekształcany jest do CO_2 z wytworzeniem cząsteczek NADH, FADH_2 oraz GTP lub ATP. Dalej następuje fosforylacja oksydacyjna w której dalsza energia jest pozyskiwana poprzez redukcję tlenu do wody^[2]. W warunkach beztlenowych pirogronian jest rozkładany do mleczanu, który wydalany na zewnątrz komórki może być również monitorowany za pomocą biocujników w hodowli.

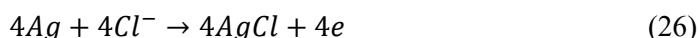
Do oznaczania stężenia glukozy oraz mleczanów zazwyczaj wykorzystuje się biocujniki enzymatyczne ze względu na wysoką specyficzność enzymów, jak również na stabilność w wysokiej temperaturze oraz pH^[3]. Są one unieruchamiane w membranie lub bezpośrednio na elektrodach. Następnie przekształcają odpowiadający każdemu z enzymów substrat tworząc produkt uboczny, który jest utleniany lub redukowany na odpowiednio spolaryzowanej elektrodzie.

W przypadku detekcji glukozy najczęściej wykorzystywane są amperometryczne czujniki oparte na enzymatycznym rozkładzie przez oksydazę glukozową. Jednak wykorzystuje się również inne enzymy jak heksokinazę lub glukozo-1-dehydrogenazę (GDH ang. *glucose-1-dehydrogenase*), które charakteryzują się niższą specyficznością i stabilnością, ale w procesie rozkładu nie zużywają cząsteczek tlenu^[4]. W czujnikach glukozy wykorzystuje się również mediatory redoks, umożliwiające pomiaru elektronów przenoszonych z enzymu^[3].

Do oznaczania tlenu cząsteczkowego najczęściej wykorzystywane są czujniki optyczne, które działają na zasadzie efektu wygaszenia spowodowanego przez tlen z barwnikiem fluorescencyjnym lub fosforescencyjnym (Rozdział 1.5.3.). Ze względu na możliwość miniaturyzacji oraz integracji z układem mikroprzepływowym, coraz częściej wykorzystuje się elektrochemiczne metody do oznaczania tlenu w pożywce hodowlanej. Wykorzystywane są metody amperometryczne m.in. oparte na bezpośrednim pomiarze na elektrodzie platynowej lub złotej^[5-8], na membranowej elektrodzie tlenowej Clarka^[9,10], czujniki typu ISFET^[11] oraz metoda SECM^[12].

Najbardziej rozpowszechniona w metodach oznaczania tlenu cząsteczkowego w roztworach jest elektroda tlenowa Clarka. Jej głównym elementem jest półprzepuszczalna membrana, zabezpieczająca układ przed wpływem zanieczyszczeń na elektrody. W klasycznym ujęciu elektroda Clarka jest układem dwuelektrodowym, który stanowi elektroda platynowa lub złota (katoda), na której zachodzi redukcja

tlenu oraz elektroda chlorosrebrowa zanurzona w roztworze elektrolitu KCl (anoda)^[13]:



W hodowlach komórkowych najczęściej wykorzystuje się zminiaturyzowaną elektrodę Clarka opartą na technologii cienkowarstwowej^[10]. Zaletą wykorzystania tego typu czujnika jest ograniczenie wpływu substancji zakłócających pomiar, oraz obecnych w pożywce hodowlanej substancji działających toksycznie na elektrodę w tym tzw. fouling elektrod (Rozdział 3)^[8,9].

Wykorzystanie bezpośredniej metody oznaczania tlenu umożliwia jednocześnie wykorzystanie wielu czujników w jednym układzie (z jedną elektrodą odniesienia i przeciwelektrodą) oraz ich rozmieszczenie w różnych miejscach układu, przede wszystkim bezpośrednim w kontakcie z komórkami^[1].

Mechanizm redukcji tlenu na elektrodach jest zależny nie tylko od pH środowiska reakcji, ale również od rodzaju powierzchni elektrody i katalizatora^[14,15]. Może zachodzić w procesie dwu- lub czteroелектронowym:



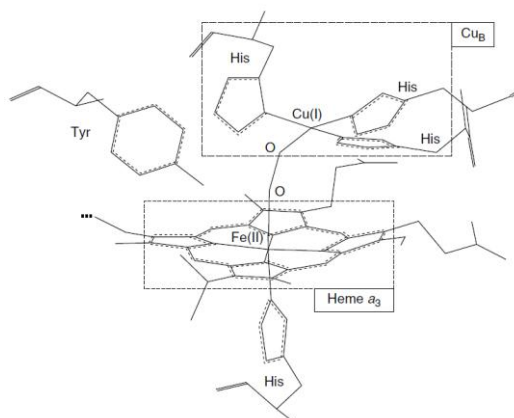
Na elektrodzie platynowej reakcja redukcji tlenu zachodzi w procesie dwuetapowym. W pierwszym etapie wytwarzany jest nadtlenek wodoru, który ulega dalszej redukcji do wody^[16]. Ze względu na wrażliwość platyny na zanieczyszczenia oraz jej wysoką cenę zaczęto poszukiwać innych rozwiązań. Reakcja redukcji tlenu (ORR ang. *oxygen reduction reaction*) ma istotne znaczenie w wielu procesach m.in. w ogniwach paliwowych, gdzie wykorzystywana jest w szerokim zakresie temperatur w pH kwaśnym i zasadowym^[17]. Wiele opracowanych katalizatorów jest dedykowanych pracy w tych właśnie skrajnych warunkach.

W środowisku o neutralnym pH mechanizm reakcji ORR jest znacznie mniej zgłębiany. Uważa się, że kinetyka procesu dwuelektronowego ORR oraz selektywność H_2O_2 są ograniczone w środowisku o pH zbliżonym do obojętnego ($6 < pH < 9$)^[18]. Opracowane katalizatory oparte na związkach nieorganicznych lub węgla powodują ogromny nadpotencjał aktywacji podczas pomiaru, co powoduje

niską aktywność katalityczną^[14]. Wykorzystanie enzymów takich jak lakaza lub oksydaza bilirubiny jako katalizatorów w ORR niweluje problem powstawania nadpotencjałów w pH 7, ale ich niska wytrzymałość oraz wysoki koszt skutkuje małym zainteresowaniem^[17].

Interesującym materiałem katalitycznym są związki M-N-C, są to najczęściej makrocycliczne związki metali przejściowych (M) takich jak żelazo, mangan, kobalt lub nikiel. Opierają się na połączeniu porfiryn i ftalocyjanin z jonami metali. Charakteryzują się one wysoką aktywnością katalityczną, jednak nie są trwałe, a redukcja tlenu przebiega z wytworzeniem nadtlenu wodoru. Po raz pierwszy ftalocyjaninę kobaltu wykorzystano w ORR w 1964 roku^[19], a kilka lat później bardziej aktywny układ dimeru porfiryny dikobaltu^[20]. Badania wykorzystujące związki ftalocyjaniny z metalami w reakcji redukcji O₂ wykazują trend aktywności w następującej kolejności: Fe(II) > Co(II) > Ni(II) > Cu(II)^[15]. Jest to związane z potencjałem jonizacji kompleksu makrocyclicznego metalu^[21,22]. Jeden z matematycznych modeli opisuje również wpływ poziomu energetycznego orbitali w atomach metali występujących w metaloporfirynach na zachodzący mechanizm ORR. Pokazuje on, że w przypadku związków żelaza bardziej prawdopodobny jest mechanizm czteroelektronowy, w którym tlen jest redukowany do wody, podczas gdy w tych samych związkach w którym atomem metalu jest kobalt, w procesie dwuelektronowym zachodzi redukcja do nadtlenu wodoru^[23].

Oksydaza cytochromu C, która w ostatnim etapie rozkładu tlenu jest odpowiedzialna za transportu elektronów, czyli redukcję O₂ do wody ma dwa centra katalityczne - Fe(II) fragmentu hemo-a₃ oraz Cu(II) fragmentu CuB – Rysunku 2.2. Szybki transfer czterech elektronów i protonu przez białkowe środowisko centrum koordynacyjnego rozszczepia podwójne wiązanie O=O bez powstawania półproduktu jakim jest cząsteczka nadtlenu^[24]. Obecność białka wpływa nie tylko na stabilność pH, ale także zapewnia stabilność termodynamiczną oraz pełni funkcję elektrokatalityczną^[25].



Rysunek 2.2. Schemat oksydazy cytochromu C^[25].

Zastosowanie polimerów przewodzących takich jak polianilina (PANI), politiofen (PTh), polipirol (PPy), poli(3,4-etylenodiotiofen) (PEDOT) czy poli(4-winylopirydyna) (PVP) jako matrycy dla związków makrocyklicznych może wpływać na wydajność redukcji tlenu^[25]. Badania z PPy wyraźnie wykazały, że przewodnictwo i porowatość polimeru pozwalają na lepszy dostęp do miejsc katalitycznych niż w przypadku elektrod planarnych oraz wykorzystania samych związków makrocyklicznych. Wyniki badań wskazują, że makrocykliczne związki Co są bardziej stabilne, ale mniej aktywne niż makrocykliczne związki Fe.

Jednym z takich katalizatorów może być również układ Fe–N/C, oparty na aminonaftalenie. Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że podobnie jak w środowisku kwaśnym, redukcja tlenu z wykorzystaniem tego katalizatora przebiega w procesie czteroelektronowym, bezpośrednio do cząsteczki wody^[26]. Przejście z mechanizmu kwasowego do zasadowego dla elektrokatalizatorów Fe–N/C zachodzi przy zasadowych wartościach pomiędzy pH 10, a pH 12, co wskazuje, że zależność mechanizmu reakcji jest silnie związana z pKa deprotonacji nadtlenu wodoru^[26,27].

Jednym z ciekawych rozwiązań może być również wykorzystanie materiałów NiSe domieszkowanych Co. Wstępne badania pokazały w ich przypadku wysoki wpływ mechanizmu dwuelektronowego w neutralnym środowisku (pH = 8,4) w porównaniu do materiałów niedomieszkowanych. Zwiększony transfer elektronów z Co do Ni, jest przypisywany wyższej elektroujemności Ni w porównaniu do Co^[18].

Procedurę napyłania złotych elektrod wykonywałam wraz z prof. dr hab. Martinem Jönsson-Niedziółką oraz dr Karthiką Kappalakandy Valapil. Mgr. Joanna Dolińska wykonała elektrody metodą druku 3D. Elektrody metodą fotolitografii zostały wykonane przez z dr inż. Emilię Witkowską-Nery, dr Karthikę Kappalakandy Valapil oraz dr. Cecilię de Carvalho Castro e Silva.

2.2. Materiały i metody

2.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

- Waga analityczna (Mettler Toledo),
- Myjka ultradźwiękowa (EMAG Technologies),
- Mieszadło z funkcją grzania (IKA),
- pH-metr (Mettler Toledo),
- Pipety automatyczne (Eppendorf),
- Grawerka laserowa CO₂ (GCC),
- Napyłarka (Leica EM MED020),
- Profilometr (Bruker ContourGT).

2.2.2. Materiały

- Elektrody z węgla szklanego (Mineral),
- Elektrody złote (Mineral),
- Papier ścierny o gradacji 1200, 800, 600,
- Płytki ITO (Delta Technologies),
- Podłoże BOROFLOAT® 33 (SCHOTT),
- Target do napyłania złota (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Target do napyłania chromu (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Target do napyłania tytanu (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Folia transparentna (Xerox),
- Elektrody wytworzone metodą druku 3D (Print-Me, Proto-Plasta, FiloAlfa),
- Probówki typu eppendorf (Bionovo),
- Końcówki do pipet (Gilson).

2.2.3. Odczynniki

4-Aminiofenol (Aldrich); alkohol izopropylowy (99,8%, Linegal Chemicals), aceton (99,8%, Linegal Chemicals) 5,10,15,20-Tetrafenylo-21H,23H- porfina kobaltu(II) (CoTPP) (Aldrich); 5,10,15,20-Tetrakis(4-metoksyfenylo)-21H,23H-porfina kobaltu(II) (CoTMPP) (Aldrich); chlorek 5,10,15,20-Tetrafenylo-21H,23H-porfiryny manganu(III) (MnTPPCL) (Aldrich); chlorek 5,10,15,20-Tetrakis(4-

metoksyfenylo)-21H,23H-porfiryny żelaza(III) (FeTMPPCl) (Aldrich); chlorek potasu (Sigma-Aldrich); dichlorometan (Sigma Aldrich); etanol (99,8%, POCH); hydroxymetylferrocene (abcr), kwas siarkowy (IV) (95% Chempur); pirol (Merck), wodorotlenek potasu KOH (>99,99%, Sigma Aldrich).

Wszystkie eksperymenty zostały wykonane z wykorzystaniem standardowego szkła laboratoryjnego stanowiącego wyposażenie laboratorium. Użyte odczynniki charakteryzowały się czystością analityczną i były przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta.

Do sporządzania wodnych roztworów wzorcowych oraz buforowych wykorzystywano wodę demineralizowaną z systemu Sartorius Arium Comfort I, o rezystancji równej 18.2 MΩ·cm.

2.3. Metody badań

2.3.1. Pomiary elektrochemiczne

Pomiary elektrochemiczne przeprowadzono za pomocą potencjostatu Autolab PGSTAT30, kontrolowanego przez oprogramowanie GPES (Eco Chemie) oraz potencjostatu PalmSens 4 potencjostatu PalmSens4 z modulem MUX8-R2 kontrolowanego przez oprogramowanie PSTrace (wersja 5.8-5.10). W São Paulo pomiary elektrochemiczne prowadzono za pomocą potencjostatu Metrohm Autolab PGSTAT204 kontrolowanego przez oprogramowanie Nova (wersja 2.1.5). Pomiary wykonano w układzie trójelektrodowym składającym się z wybranej elektrody pracującej, elektrody odniesienia Ag/AgCl (3 M KCl) (IJ Cambria Scientific Ltd.) o średnicy 2 mm oraz drutu platynowego o średnicy 1 mm (Mennica Metale Sp. z o.o.) jako elektrody pomocniczej.

2.3.2. Przygotowanie elektrod

Do badań przedstawionych w niniejszym rozdziale wykorzystano:

- komercyjne elektrody złote o średnicy 3 mm,
- elektrody złote wytworzone za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni,
- elektrody ITO-Au wytworzone przy użyciu plotera laserowego CO₂ a następnie za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni,
- elektrody wytworzone metodą druku 3D,
- elektrody grafenowe indukowane laserowo (LIG),
- elektrody wytworzone metodą fotolitografii.

Elektrody z węgla szklistego oraz komercyjne elektrody złote przygotowano poprzez polerowanie powierzchni elektrod przy użyciu Al_2O_3 o ziarnistości 1 μm , 0,3 μm i 0,05 μm a następnie opłukanie w wodzie dejonizowanej i wysuszenie w temperaturze otoczenia. Elektrody złote dodatkowo czyszczono w 0,01 M roztworze H_2SO_4 .

Elektrody ITO-Au oraz elektrody złote przygotowano poprzez poddanie elektrod zanurzonych w roztworze (1) izopropanolu oraz (2) wody zdemineralizowanej działaniu ultradźwięków przez 15 min.

Elektrody zmodyfikowano poprzez:

- **PPy** - depozycję elektrochemiczną na elektrodzie z 1 mM roztworu PPy w 10 mM PBS o pH 7,4; zakres potencjału od 1,0 V do -0,2 V, szybkość skanowania 50 mV/s, 5 cykli^[28].
- **PTh** - zanurzenie elektrod na 2h w 10 mM roztworze 4-ATP w EtOH^[29]
- **PANI** - depozycję elektrochemiczną na elektrodzie w 0,5 M roztworze H_2SO_4 zawierającym 0,1 M aniliny oraz 0,05 mM FeTSPP; zakres potencjału od 0,2 V do 0,8 V; szybkość skanowania 20 mV/s, 8 cykli^[30]

oraz:

- **CoTPP** - nakropienie na elektrodę 10 μL 1 mM roztworu CoTPP w CH_2Cl_2 ,
- **CoTMPP** - nakropienie na elektrodę 10 μL 1 mM roztworu CoTMPPCl w CH_2Cl_2 ,
- **FeTMPPCl** - nakropienie na elektrodę 10 μL 1 mM roztworu FeTMPPCl w CH_2Cl_2 ,
- **MnTPP** - nakropienie na elektrodę 10 μL 1 mM roztworu MnTPPCl w CH_2Cl_2 ^[31].

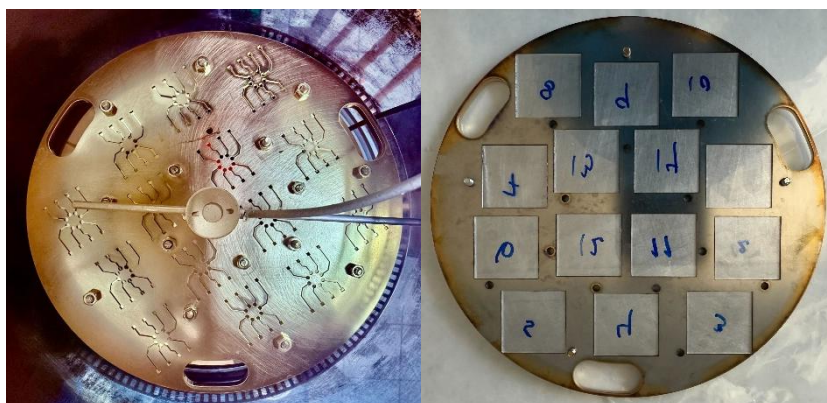
2.3.3. Proces napyłania elektrod

Procedura napyłania była wykonywana przeze mnie przy pomocy dr Karthiką Kappalakandy Valapil oraz prof. dr hab. Martinem Jönsson-Niedziółką.

Jako materiał bazowy zostało wykorzystane podłoże BOROFLOAT® 33 o wymiarach 25 mm x 25 mm x 5 mm, na którą najpierw została napyłona warstwa tytanu (1) lub chromu (2) o grubości 10 nm, a następnie warstwa złota o grubości 100 nm. Warstwa chromu lub tytanu została naniesiona za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni (o wartości 10^{-3} mbar), natomiast warstwa złota została naniesiona w wysokiej próżni o wartości 10^{-2} mbar. Do tego procesu wykorzystano okrągły

kawałek (1) tytanu lub (2) chromu oraz złota o średnicy 50 mm. Podczas napyłania próbki zostały umieszczone na obrotowym uchwycie.

W badaniach wykorzystano elektrody wytworzone w procesie fotolitografii, elektrody przygotowane z wykorzystaniem grawerki laserowej CO₂ oraz wytworzonej maski (Rysunek 2.3.).

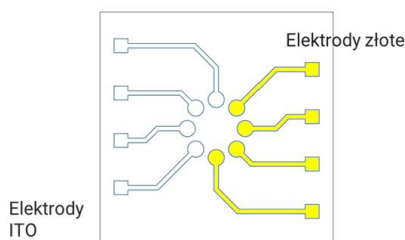


Rysunek 2.3. Maska z pozwalająca na precyzyjne napylenie złotych elektrod w procesie napyłania w wysokiej próżni.

2.3.4. Proces wytworzenia elektrod ITO-Au

Metoda wytworzenia elektrod ITO (ang. *indium tin oxide*) została opracowana i opisana w pracy doktorskiej Dr Karthiki Kappalakandy Valapil^[32,33]. Szklane płytki o wymiarach 25 mm x 25 mm x 1,1 mm pokryte ITO (~130 nm, $R_s = 5-15 \Omega/\text{sq}$) zostały pokryte taśmą kaptonową, a następnie przy użyciu oprogramowania CAD oraz grawerki laserowej CO₂ o następujących parametrach: prędkość 2,0, moc 1% i PPI (impulsy na cal) 1500, geometria układu elektrod została odwzorowana na płytce. Następnie taśma z powierzchni nieelektrodowej została zdjęta (elektrody pozostały zakryte kaptonem), a podłoże ITO zostało wytrawione w roztworze 1,15 M KOH w 80% etanolu. Po zdjęciu taśmy z powierzchni elektrod, elektrody zostały poddane działaniu ultradźwięków przez 15 min w roztworze acetonu, izopropanolu i wody^[32].

Po wytworzeniu elektrod ITO, na tej samej powierzchni przygotowano elektrody w procesie napyłania w wysokiej próżni opisane w Rozdziale 2.3.3. przy użyciu maski, zakrywając połowę otworów, tak aby złoto nie zostało napyłone na elektrody ITO (Rysunek 2.4.).



Rysunek 2.4. Macierz elektrodowa na której przygotowano cztery elektrody ITO (kolor biały) oraz elektrody złote przygotowane w procesie napyłania w wysokiej próżni (kolor żółty).

2.3.5. Proces wytworzenia elektrod LIG

Elektrody LIG (ang. *Laser-Induced Graphene electrodes*) zostały przygotowane podczas stażu na Uniwersytecie Presbiteriana Mackenzie w São Paulo. Geometria układu elektrod została odwzorowana poprzez wygrawerowanie laserem na taśmie poliimidowej Kapton® przy użyciu oprogramowania CAD oraz grawerki laserowej zgodnie z literaturą^[34].

2.4. Wyniki i dyskusja

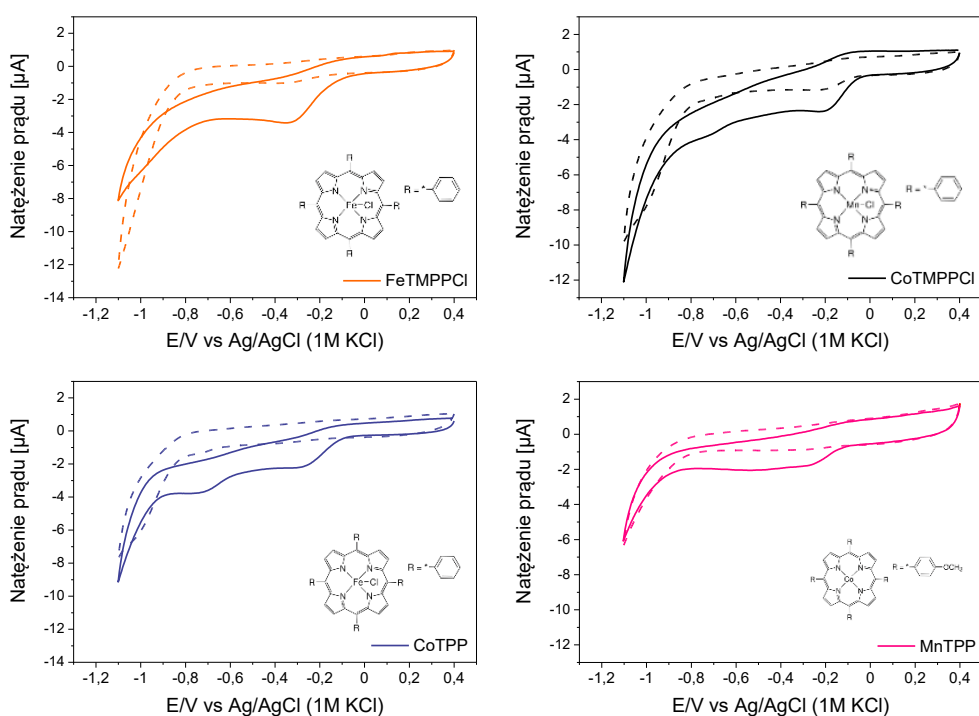
Celem badań zaprezentowanych w niniejszym rozdziale było wytworzenie elektrod, które umożliwią pomiar metabolizmu w hodowlach komórkowych, zarówno w hodowlach 2D jak i 3D. W pierwszym etapie badań skoncentrowano się na elektrodach umożliwiających pomiar tlenu cząsteczkowego, w hodowlach neuronalnych. Potencjał spoczynkowy komórek nerwowych wynosi $-0,07\text{ V}$, z tego względu w pierwszym kroku podjęto się zidentyfikowania katalizatora, który umożliwiłby przeprowadzenie reakcji redukcji tlenu w pożywce hodowlanej o pH 7,4 przy niskim nadpotencjale. W kolejnych krokach podjęto próbę wytworzenia oraz scharakteryzowania elektrod, które mogłyby zostać wykorzystane w hodowlach komórkowych.

2.4.1. Dobór katalizatora redukcji tlenu w niskim nadpotencjale

W pierwszym kroku oceniono możliwość wykorzystanie takich materiałów jak makrocycliczne związki metali przejściowych – CoTPP, CoTMPP, FeTMPPCl oraz MnTPPCl w procesie redukcji tlenu na elektrodach złotych o średnicy 3 mm. Dodatkowo oceniono wpływ polimerów przewodzących (PPy, PANI oraz PTh) na proces redukcji tlenu. Badane elektrody pokryte warstwą wybranych materiałów analizowano w roztworach o różnej zawartości tlenu – w roztworze odtlenionym

poprzez argonowanie roztworu argonem technicznym oraz w roztworze będącym w równowadze z powietrzem. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 2.5.-2.8.

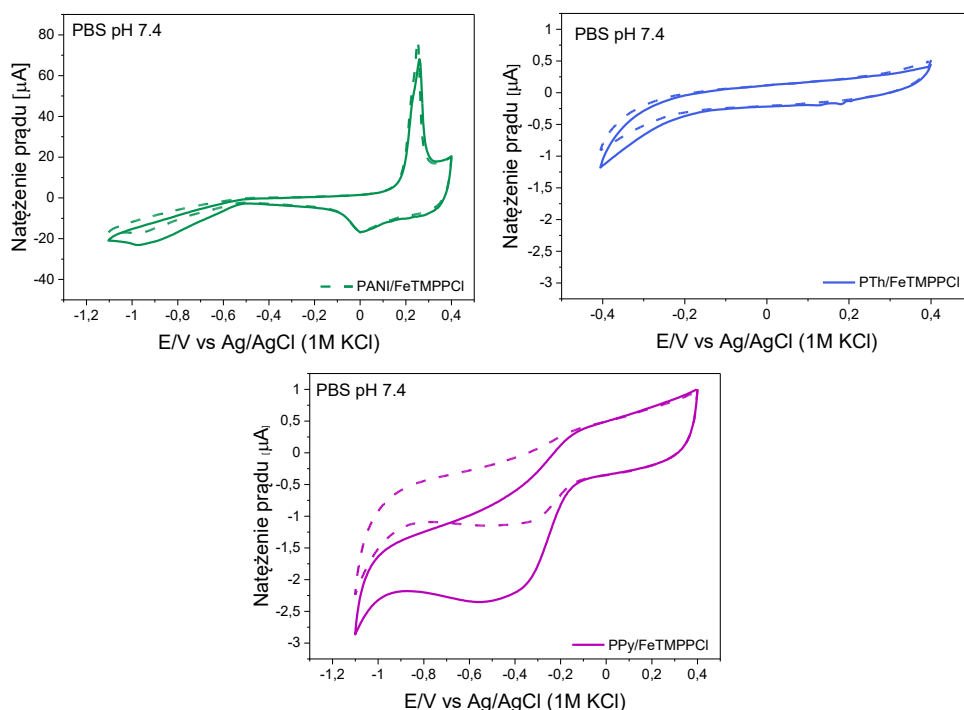
Na woltamperogramach zarejestrowanych dla elektrod zmodyfikowanych metaloporfirynami w roztworze buforowym będącym w równowadze z powietrzem o pH 7,4 zaobserwowano piki katodowe (Rysunek 2.5.). Podczas pomiaru w roztworze nasyconym argonem są niewidoczne lub znacznie zmniejszone, dlatego można to przypisać procesowi redukcji tlenu. Potencjały początku fali katalitycznej redukcji tlenu (potencjał onset ang. *onset potential*) wynoszą -0,01 V oraz -0,016 V odpowiednio dla związków FeTMPPCl oraz CoTMPP. Natomiast dla pozostałych związków jest on przesunięty w stronę negatywnych potencjałów i wynosi odpowiednio -0,075 V i -0,11 V dla związków CoTPP i MnTMPPCl.



Rysunek 2.5. Woltamperogramy cykliczne uzyskane na elektrodach złotych modyfikowanych makrocykliczne związki metali przejściowych – CoTPP, CoTMPP, FeTMPPCl oraz MnTMPPCl w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.

Analiza zarejestrowanych krzywych dla elektrod pokrytych dodatkową warstwą polimeru wskazała jedynie znaczny wpływ PPy na proces redukcji tlenu w środowisku obojętnym w roztworze buforowym o pH 7,4. Na zarejestrowanej

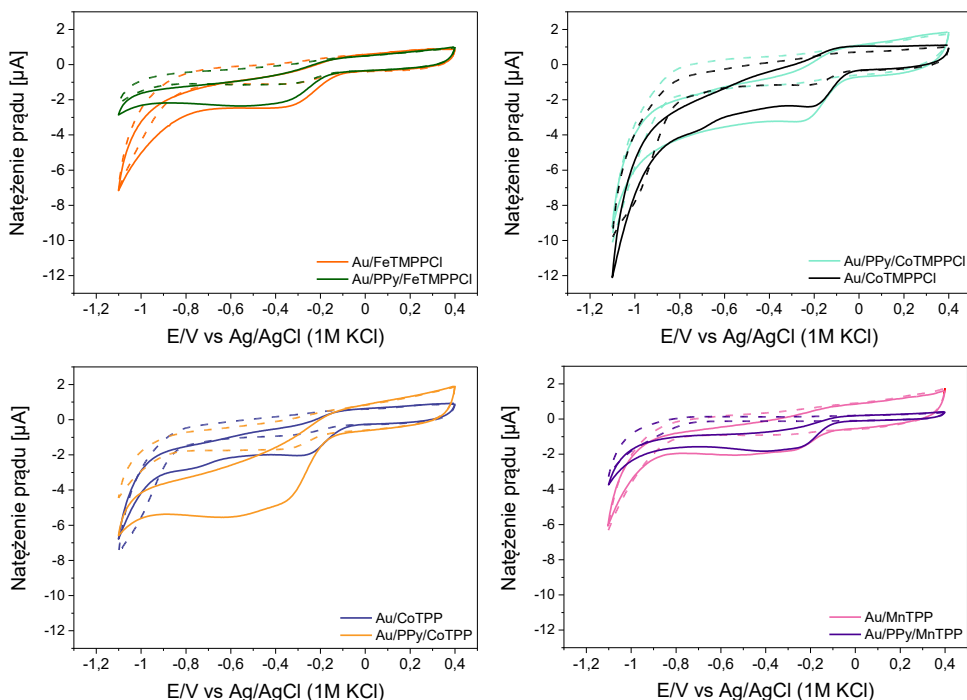
krzywej zaobserwowano zanik piku katodowego w roztworze nasyconym argonem. Wpływ PTh zaobserwowano jedynie w środowisku kwaśnym w roztworze buforowym o pH 4,0. W przypadku modyfikacji PTh/FeTMPPCl potencjał początku fali katalitycznej redukcji tlenu uległ przesunięciu w stronę pozytywnych potencjałów. Wartość potencjału onset dla modyfikacji wynosi 0,12 V. Natomiast zastosowanie dodatkowej warstwy polianiliny nie przyniosło oczekiwanych rezultatów (Rysunek 2.6.).



Rysunek 2.6. Woltamperogramy cykliczne uzyskane na elektrodach złotych modyfikowanych warstwą polimerów przewodzących PANI, PPy, oraz PTh, a następnie FeTMPPCl w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.

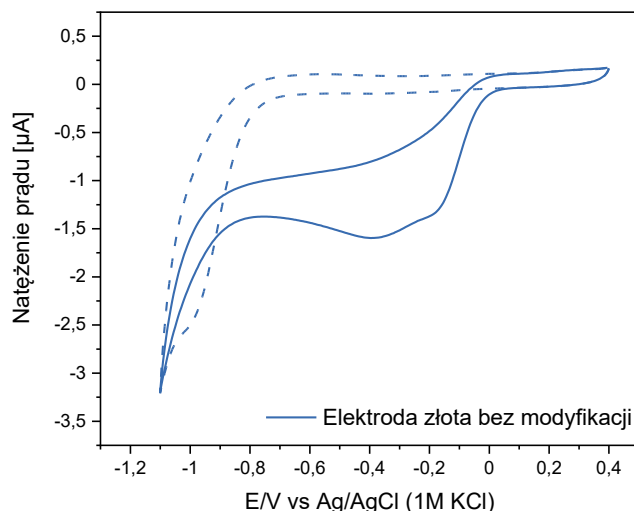
Na zarejestrowanych krzywych dla elektrod pokrytych warstwy polipirołu i kompleksem porfiryna-metal nie zaobserwowano znaczącego wpływu dodatkowej warstwy polimeru na wartość potencjału początku fali katalitycznej redukcji tlenu (Rysunek 2.7.). Wartość potencjałów dla wszystkich modyfikacji została przesunięta w stronę negatywnych potencjałów. Potencjały początku fali katalitycznej redukcji tlenu wynoszą odpowiednio -0,12 V, -0,013 V, -0,016 V, -0,083 V dla związków FeTMPPCl, CoTPP, CoTMPP oraz MnTPP. Dla modyfikacji PPy/FeTMPPCl otrzymano trzykrotnie wyższą wartość natężenia prądu niż dla pozostałych

kompleksów. Jest jednak ona porównywalna dla obu modyfikacji (z FeTMPPCl oraz PPy/FeTMPPCl). W przypadku modyfikacji PPy/CoTPP otrzymana wartość natężenia prądu jest dwukrotnie niższa niż dla modyfikacji bez warstwy polipirołu.



Rysunek 2.7. Woltamperogramy cykliczne uzyskane na elektrodach złotych modyfikowanych makrocyclicznymi związkami metali przejściowych – CoTPP, CoTMPP, oraz FeTMPPCl oraz dodatkową warstwą polimeru – PPy/CoTPP, PPy/CoTMPP oraz PPy/FeTMPPCl w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.

Porównując zarejestrowane krzywe dla elektrody złotej niemodyfikowanej oraz modyfikowanej pirolem, a także metaloporfiryną (Rysunek 2.8.), można zauważyć, że mimo modyfikacji „zakres potencjału” redukcji tlenu pozostaje podobny. Dodatkowo można zaobserwować, że wartość natężenia prądu z wyjątkiem PPy/CoTPP dla wszystkich modyfikacji jest podobna.



Rysunek 2.8. Woltamperogram cykliczny uzyskany dla elektrody złotej bez modyfikacji w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.

2.4.2. Ocena możliwości wykorzystania elektrod w pomiarze metabolizmu w hodowlach komórkowych

2.4.2.1. Ocena możliwości wykorzystania elektrod złotych wytworzonych za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni.

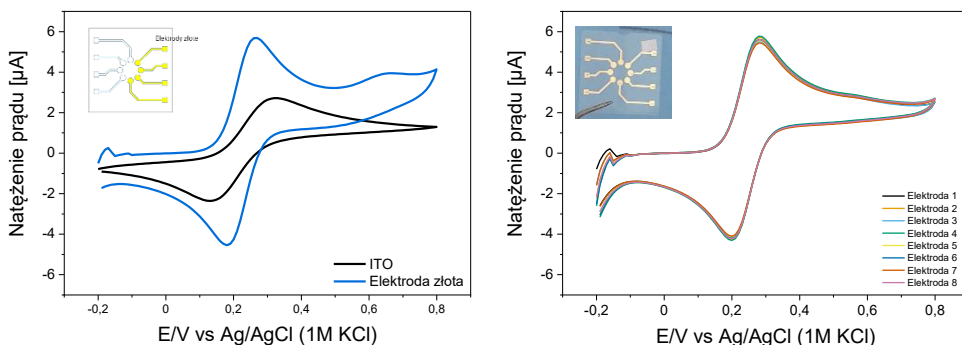
W drugim etapie badań oceniono wpływ wybranego PPy/ FeTMPPCl na złotych elektrodach o średnicy 1,75 cm² wytworzonych za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni. Wykorzystano trzy typy elektrod: układ ośmiu elektrod złotych (1) oraz czterech elektrod złotych i czterech elektrod ITO (2) o geometrii układu przedstawionej na Rysunku 2.4., na której osiem elektrod zostało umieszczonych w okręgu na płytce o wymiarach 25 mm x 25 mm oraz elektrody napyłane na folii transparentnej o tej samej średnicy (3).

Na początku badano odpowiedź wszystkich elektrod w roztworze 1 mM Fc(MeOH)₂ 0,1 M KCl w celu analizy powierzchni elektrod oraz ich sygnałów elektrochemicznych. Następnie elektrody zmodyfikowano warstwą polipirołu oraz wybranym związkiem makrocyklicznym – TMPPFeCl, podobnie jak w Rozdziale 2.4.1. Wyniki przedstawiono na rysunkach 2.9.-2.12.

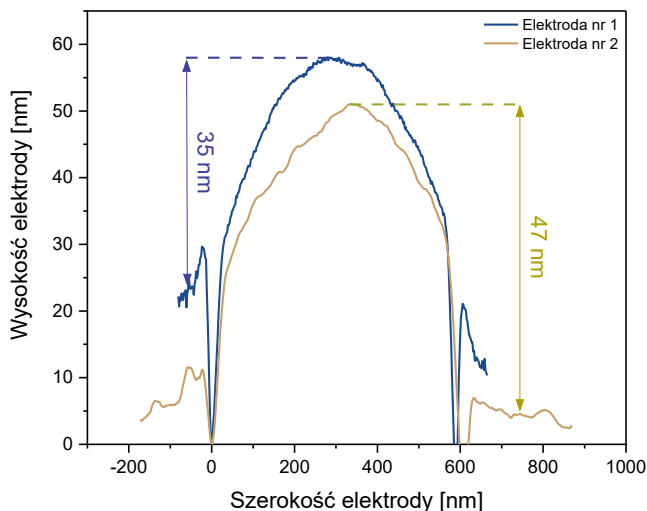
Elektrody ITO zostały wykorzystane przez dr Karthikę Kappakalandy Valapil w ramach pracy doktorskiej do pomiarów elektrochemicznej impedancji

spektroskopowej w celu badania adhezji komórek na elektrodach. Z tego powodu postanowiono połączyć na jednej matrycy elektrody ITO do badania adhezji komórek oraz elektrody złote do oznaczania tlenu w hodowli komórkowej. Podczas analizy woltamperogramów zarejestrowanych w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w 0,1 M KCl zauważono znaczącą różnicę w wysokościach otrzymanych pików zarówno pików redukcji jak i utlenienia (Rysunek 2.9.). Z tego powodu postanowiono zrezygnować z tej metody wytwarzania elektrod, a pomiary impedancji przeprowadzić na elektrodach złotych.

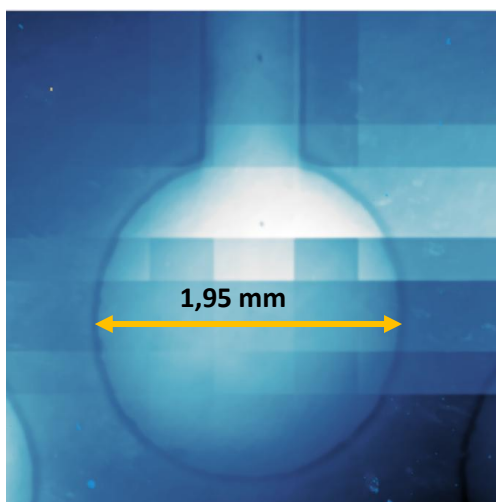
Proces napylenia wykonywano w wysokiej próżni. Początkowo do wyznaczenia zakresu powierzchni elektrod została wykorzystana taśma klejąca (Scotch), na której z wykorzystaniem grawerki laserowej CO_2 wycinano kształt elektrod. W późniejszych etapach pracy wykorzystywano maskę, która pozwoliła ominąć proces samego wycinania. Proces ten pozwolił na uzyskanie elektrod o wysokiej powtarzalności (Rysunek 2.9.). Analiza profilometryczna pozwoliła ocenić rzeczywistą wysokość naniesionej warstwy złota (Rysunek 2.10.). Początkowo proces napyłania odbywał się dla zadanych ustawień 100 nm warstwy złota, a następnie zwiększono napyłoną warstwę do 150 nm. Niestety w obu przypadkach nie uzyskano zadanej warstwy złota, a o prawie trzy razy mniejszą w obu przypadkach. Wysokość elektrod różniła się między sobą $\pm 0,5$ nm dla elektrod uzyskanych w jednym procesie. Nie znaleziono korelacji dla położenia podłoża elektrody podczas procesu napyłania. Zmierzona średnica elektrod (powierzchni aktywnej) była zbliżona do średnicy otworu maski wykorzystywanej podczas procesu napyłania. Różnica wyniosła 0,20 mm (Rysunek 2.11.).



Rysunek 2.9. Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni – elektrody ITO/Au (1), elektrody złote (2) w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w 0,1 M KCl. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s.



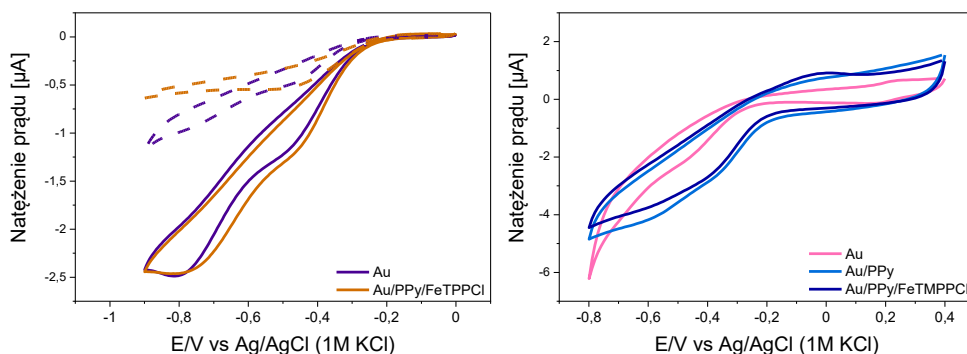
Rysunek 2.10. Przekrój wysokości ścieżki elektrycznej elektrod złotych wytworzonych na podłożu BOROFLOAT® 33 wyznaczonej za pomocą profilometru.



Rysunek 2.11. Zdjęcie powierzchni aktywnej elektrody złotej wytworzonej na podłożu BOROFLOAT® 33 utworzone za pomocą analizy profilometrycznej.

W kolejnym etapie elektrody złote zostały zmodyfikowane wybranym związkiem PPy/FeTMPPCl. Analiza zarejestrowanych krzywych (Rysunek 2.12.) dla elektrod niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych warstwą polipirolu i FeTMPPCl wykazała znaczne przesunięcie potencjału onset dla elektrod zmodyfikowanych. Wartość potencjału wynosi $-0,153\text{ V}$ dla elektrody niemodyfikowanej i $-0,28\text{ V}$ dla modyfikacji PPy/FeTMPPCl. W porównaniu do elektrod krystalicznych złotych jest

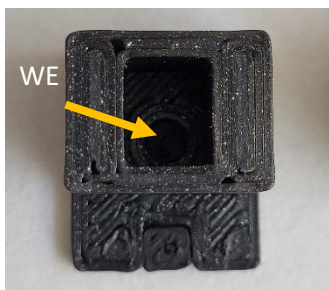
to znaczące przesunięcie potencjału onset w kierunku negatywnych potencjałów. Proces modyfikacji wykonano kilkakrotnie. Pomimo różnicy w oknie potencjału w wykonywanych pomiarach oraz braku pomiaru w roztworze nasyconym argonem dla drugiego procesu modyfikacji, można zauważyć znaczną różnicę w przesunięciu pomiędzy odpowiedzią dla elektrody złotej niemodyfikowanej i dla modyfikacji PPy/FeTMPPCl. Choć w przypadku modyfikacji elektrod na jednej macierzy proces ten wydaje się powtarzalny, dużo trudniej otrzymać ten sam sygnał pomiędzy samymi macierzami elektrod.



Rysunek 2.12. Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod złotych wytworzonych za pomocą procesu napylania w wysokiej próżni – bez modyfikacji (Au), elektrod złotych modyfikowanych tylko warstwą polipirolu (Au/PPy) oraz elektrod złotych modyfikowanych warstwą polipirolu oraz FeTMPPCl (Au/PPy/FeTMPPCl) w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.

2.4.2.2. Ocena możliwości wykorzystania elektrod wytworzonych za pomocą druku 3D

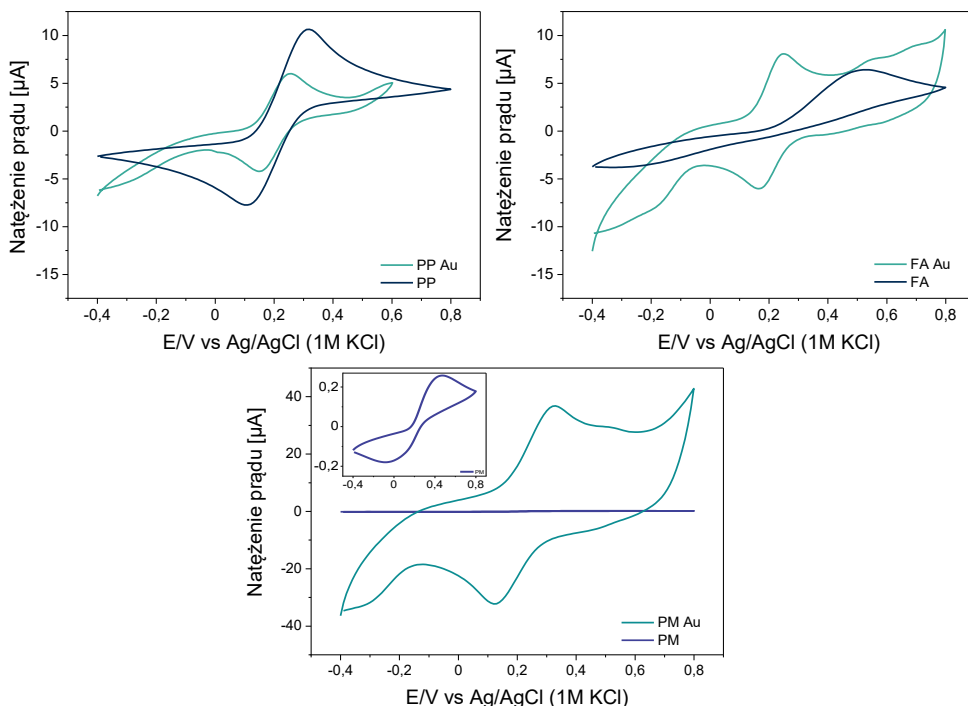
W kolejnym etapie zbadano możliwość wykorzystania elektrod o średnicy 3 mm wytworzonych za pomocą druku 3D – Rysunek 2.13. Elektrody zostały wykonane w ramach współpracy z mgr. Joanną Dolińską. Elektrody zostały wytworzone z filamentu z kwasu polimlekowego (PLLA) z dodatkiem węgla zakupionego od trzech różnych producentów - Proto-Pasta (PP), FiloAlfa (FA) oraz Print-me (PM). Elektrody zostały zmodyfikowane nanocząstkami złota.



Rysunek 2.13. Elektroda wytworzona metodą druku 3D.

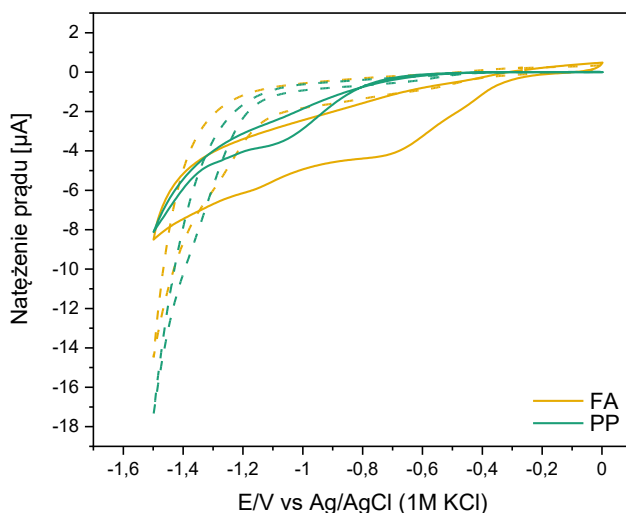
W pierwszym etapie badano odpowiedź wszystkich elektrod w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ 0,1 M KCl w celu analizy powierzchni elektrod oraz ich sygnałów elektrochemicznych. Następnie elektrody zmodyfikowano warstwą polipirolu oraz wybranym związkiem makrocyklicznym – CoTPP, podobnie jak w Rozdziale 2.4.1. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 2.14-2.16.

Dla elektrod PP uzyskano najlepszy sygnał elektroanalityczny w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w 0,1 M KCl. W przypadku elektrod FA uzyskano przesunięcie maksimum pików utleniania w kierunku dodatnich potencjałów, natomiast sygnał pików redukcji był znacznie mniejszy. Dla elektrod FA modyfikowanych cząstkami złota, uzyskano piki utleniania i redukcji o podobnej wysokości. Dodatkowo na krzywej zaobserwowano dodatkowe piki prawdopodobnie spowodowane zanieczyszczeniem powstałym podczas modyfikacji elektrod. W przypadku elektrod PM również uzyskano przesunięcie maksimum pików utleniania w kierunku dodatnich potencjałów. Modyfikacja elektrod PM nanocząstkami złota wyraźnie zwiększyła pojemność elektrody.



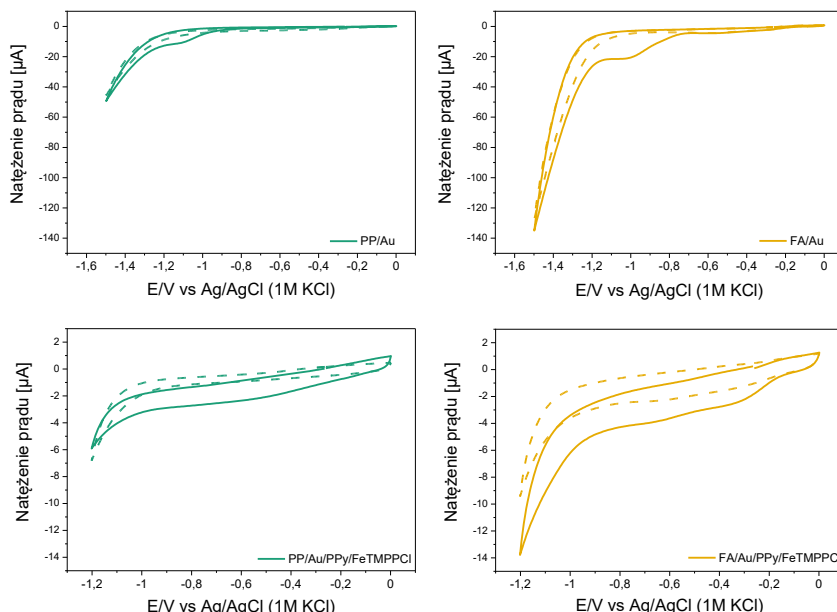
Rysunek 2.14. Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych metodą druku 3D z PLLA zakupionego od różnych producentów - Proto-Pasta (PP), FiloAlfa (FA) oraz Print-Me (PM) w roztworze 1 mM Fc(MeOH)₂ w 0,1 M KCl. Inset pokazuje krzywą uzyskaną dla elektrody PM. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s.

Następnie odpowiedź elektrod niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych nanocząstkami złota analizowano w roztworze buforowym PBS o pH 7,4 o różnej zawartości tlenu – w roztworze odtlenionym poprzez argonowanie roztworu argonem technicznym oraz w roztworze będącym w równowadze z powietrzem. W obu przypadkach dla elektrod niemodyfikowanych PP i FA na krzywej zaobserwowano wyraźny pik katodowy (Rysunek 2.15), który jest nie widoczny na krzywej zarejestrowanej podczas pomiaru w roztworze nasyconym argonem (PP) lub jest on wyraźnie zmniejszony (FA). Podobnie jak na elektrodach złotych można to przypisać procesowi redukcji tlenu. Potencjał onset dla elektrody PP wyniósł -0,75 V, a dla FA -0,36 V. W przypadku elektrod niemodyfikowanych PM nie uzyskano stabilnego sygnału podczas pomiaru w roztworze buforowym.



Rysunek 2.15. Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych metodą druku 3D z PLLA od firmy Proto-Pasta (PP) i FiloAlfa (FA). Krzywe uzyskane dla elektrod nie modyfikowanych w roztworze buforowym PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.

Modyfikacja elektrody nanocząstkami złota pozwoliła na przesunięcie potencjału onset w stronę negatywnych potencjałów (Rysunek 2.16.). Dla elektrody PP/Au wyniósł -1.0 V, a dla FA/Au -0,75 V. Podobnie jak podobnie w poprzednim podrozdziale sprawdzono wpływ polipirolu oraz związku FeTMPPCl. Pozwoliło to na przesunięcie potencjału onset w stronę pozytywnych potencjałów. Dla elektrody PP/Au/PPy/FeTMPPCl wyniósł -0.11 V, a dla FA/Au/PPy/ FeTMPPCl -0,17 V.



Rysunek 2.16. Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych metodą druku 3D z PLLA od firmy Proto-Pasta (PP) i FiloAlfa (FA). Krzywe uzyskane dla elektrod modyfikowanych nanocząstkami złota (górny wiersz) oraz elektrod modyfikowanych nanocząstkami złota, a następnie PPy oraz FeTMPPCl (dolny wiersz) w roztworze buforowym PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.

2.4.2.4. Ocena możliwości wykorzystania elektrod LIG

W kolejnym etapie zbadano możliwość wykorzystania grafenowych elektrod indukowanych laserowo (LIG) na podłożu poliimidowym. Elektrody zostały wykonane podczas stażu na Uniwersytecie Mackenzie w São Paulo pod opieką dr Cecíli de Carvalho Castro e Silva.

Na początku elektrody zostały wytworzone wg wzoru nr 1 (Rysunek 2.17.), jednak zauważono brak przewodności na całej elektrodzie. Prawdopodobnie jest to spowodowane specyficznym sposobem prowadzenia wiązki laserowej, która przy fragmencie zakrętu traci połączenie z poprzednim fragmentem elektrody. Podobny problem zauważono przy prostych, ale długich elektrodach. Elektrody wzmocniono srebrnym przewodzącym klejem i wyznaczono powierzchnię pracującą elektrod

(wzór nr 2). Elektrody scharakteryzowano w roztworze 10 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w 0,1 M KCl.

Wzór nr 1

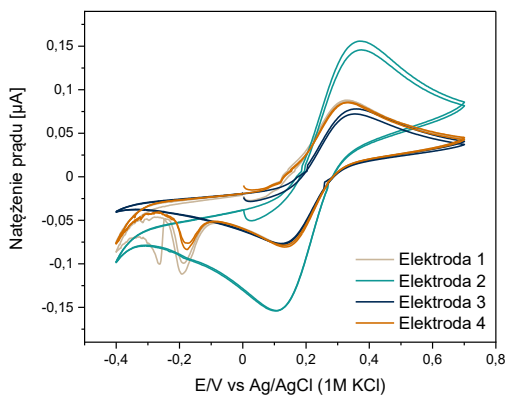


Wzór nr 2

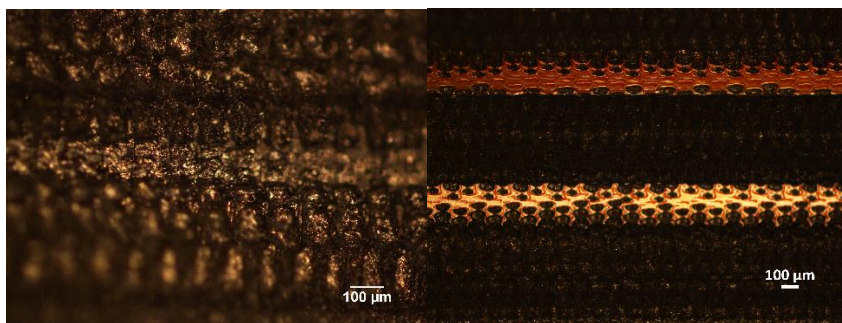


Rysunek 2.17. Elektrody LIG.

Podczas analizy woltamperogramów uzyskanych dla elektrod LIG zauważono różną wielkość krzywych uzyskanych dla poszczególnych elektrod podczas jednego druku (Rysunek 2.18.). Najczęściej uzyskiwano podobną wysokość pików utleniania i redukcji dla dwóch środkowych i brzegowych elektrod. Jednak, również pomiędzy matrycami wielkość elektrod była różna. Jednym z powodów może być niedokładne wyznaczenie obszaru samej elektrody. Dodatkowo wycięte fragmentu folii polimidowej z nadrukowanymi elektrodami zginały się, co mogło wpływać na sygnał podczas pomiaru. Podczas pomiarów elektrochemicznych zwrócono uwagę na problem braku rozseparowania elektrod (Rysunek 2.19.).



Rysunek 2.18. Woltamperogram cykliczny uzyskany dla elektrod LIG w roztworze 10 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w 0,1 M KCl. Szybkość zmian potencjału 30 mV/s.

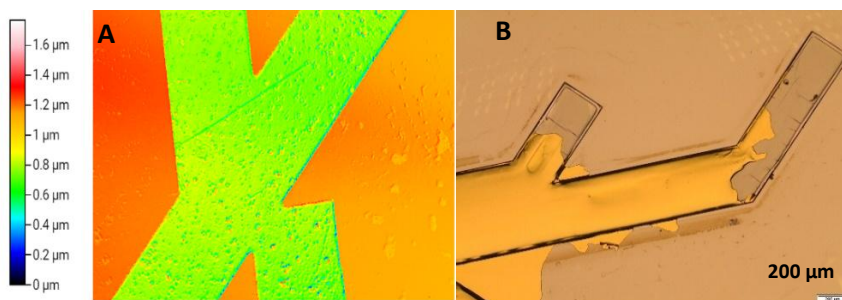


Rysunek 2.19. Analiza mikroskopowa rozseparowania elektrod LIG przedstawiająca elektrody nierozseparowane (A) oraz odpowiednio rozseparowane (B).

2.4.2.3. Ocena możliwości wykorzystania elektrod wytworzonych w procesie fotolitografii

W tym etapie zbadano możliwość wykorzystania elektrod wytworzonych w procesie fotolitografii. Elektrody zostały wykonane dwukrotnie w dwóch różnych laboratoriach przez dr inż. Emilią Witkowską-Nery, dr Karthiką Kappalakandy Valapil oraz dr. Cecilią de Carvalho Castro e Silva, natomiast w żadnym procesie nie uzyskano powtarzalnych elektrod, które można by wykorzystać w dalszych badaniach.

Elektrody poddano analizie profilometrycznej, podczas której zauważono liczne nierówności mogące wpływać na sygnał pomiaru. Dodatkowo zauważono brak ciągłości powierzchni elektrod. Podczas drugiego procesu wytwarzania elektrod, na etapie oddzielenia fotorezystu oraz pokrywającej go cienkiej warstwy część substratu została usunięta razem z fotorezystem powodując zniszczenie części elektrod, szczególnie obszaru samej elektrody (Rysunek 2.20.).



Rysunek 2.20. Analiza profilometryczna dla fotorezystu podczas wytwarzania elektrod metodą fotolitografii (A) oraz analiza mikroskopowa elektrod po etapie oddzielenia fotorezystu od substratu (B).

2.5. Wnioski

Opisane w niniejszym rozdziale prace badawcze skupiały się na zidentyfikowaniu materiału umożliwiającego przeprowadzeniu reakcji redukcji tlenu w niskim nadpotencjale, a także na ocenie możliwości wykorzystania różnego typu elektrod w monitorowaniu tlenu cząsteczkowego w hodowli komórkowej. Początkowy etap badań został przeprowadzony na komercyjnych elektrodach złotych. Analiza wyników badań potwierdziła niewielki wpływ modyfikacji elektrod za pomocą takich jak polimery przewodzące i makrocycliczne związki metali przejściowych na reakcję redukcji tlenu w porównaniu na elektrodach złotych do wyników uzyskanych na elektrodach złotych wytworzonych w procesie napyłania bez modyfikacji oraz elektrod wytworzonych metodą druku 3D.

Proces napyłania elektrod złotych umożliwił otrzymanie trwałych elektrod o tej samej powierzchni aktywnej nie tylko na jednej macierzy elektrodowej, ale również na wielu macierzach, co umożliwia ich dalsze wykorzystanie w hodowli komórkowej. Ze względu na brak powtarzalnego sygnału po modyfikacji elektrod polipirolem oraz metaloporfiryną, zrezygnowano w dalszej części pracy z modyfikowania elektrod. Obecnie w wielu badaniach w hodowlach komórkowych do oznaczania lub monitorowania stężenia tlenu wykorzystuje się elektrody oparte tylko na czystych metalach szlachetnych (niemodyfikowanych)^[1,35] ze względu na skomplikowanie procesu fabrykacji oraz konieczność prowadzenia dodatkowych badań toksyczności lub jego braku na komórki.

W ramach badań sprawdzono również możliwość wykorzystania elektrod wytworzonych metodą druku 3D. Oceniono negatywnie wpływ nanocząstek złota na przesunięcie początku potencjału fali katalitycznej tlenu (potencjał onset) w stronę negatywnych potencjałów. Dodatkowo otrzymano znacznie większe wartości natężenia prądu niż dla samych elektrod nie pokrytych nanocząstkami złota. Choć dodatkowa modyfikacja elektrod poprzez elektrochemiczną depozycję polipirołu oraz związkiem porfiryny pozwoliła na znaczące przesunięcie potencjału onset w stronę pozytywnych potencjałów, konieczna jest jednak optymalizacja pod względem stabilności modyfikacji w pożywcze hodowlanej, a także ewentualnego braku toksycznego wpływu na komórki.

Obecnie istnieją nieliczne doniesienia wykorzystania elektrod LIG w hodowlach komórkowych. Ich zaletą jest porowata struktura oraz prosta synteza w postaci jednoetapowego procesu bezpośrednio na docelowym materiale^[36], jednak występujące znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi partiami(macierzami) elektrod obecnie uniemożliwiają ich wykorzystanie na szerszą skalę^[37].

Proces fotolitografii jest stosowany między innymi w procesach fabrykacji układów mikroprzepływowych, ze względu na możliwość wytworzenie elektrod o skomplikowanych kształtach z wysoką precyzją (poniżej 5 nm)^[38]. Jednak jest on wieloetapowy i wymaga pracy na specjalistycznym sprzęcie w warunkach o podwyższonej czystości (tzw. clean roomach). Problemy z odwzorowaniem stanowią główną przeszkodę na początkowym etapie pracy wytworzenia układów do hodowli komórkowych, dlatego często poszukiwane są inne rozwiązania^[39].

2.6. Literatura

1. Kieninger J, Weltin A, Flamm H, Urban GA. Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip. *Lab Chip*. 2018;18(9):1274-1291.
2. Alberts B et al. W jaki sposób komórki uzyskują energię z pożywienia. In: *Podstawy Biologii Komórki*. Vol II. PWN; 2009:427-453.
3. Chen C, Xie Q, Yang D, et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *RSC Adv*. 2013;3(14):4473.
4. Witkowska Nery E, Kundys M, Jeleń PS, Jönsson-Niedziółka M. Electrochemical Glucose Sensing: Is There Still Room for Improvement? *Anal Chem*. 2016;88(23):11271-11282.
5. Eklund SE, Taylor D, Kozlov E, Prokop A, Cliffel DE. A Microphysiometer for Simultaneous Measurement of Changes in Extracellular Glucose, Lactate, Oxygen, and Acidification Rate. *Anal Chem*. 2004;76(3):519-527.
6. Marzioch J, Kieninger J, Weltin A, et al. On-chip photodynamic therapy – monitoring cell metabolism using electrochemical microsensors. *Lab Chip*. 2018;18(22):3353-3360.
7. Dornhof J, Kieninger J, Muralidharan H, Maurer J, Urban GA, Weltin A. Microfluidic organ-on-chip system for multi-analyte monitoring of metabolites in 3D cell cultures. *Lab Chip*. 2022;22(2):225-239.
8. Weltin A, Slotwinski K, Kieninger J, et al. Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. *Lab Chip*. 2014;14(1):138-146.
9. Wu CC, Luk HN, Lin YTT, Yuan CY. A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of the respiratory activity of adhering cells. *Talanta*. 2010;81(1-2):228-234.
10. Liebisch F, Weltin A, Marzioch J, Urban GA, Kieninger J. Zero-consumption Clark-type microsensor for oxygen monitoring in cell culture and organ-on-chip systems. *Sens Actuators B Chem*. 2020;322:128652.
11. Lehmann M, Baumann W, Brischwein M, et al. Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET. *Biosens Bioelectron*. 2001;16(3):195-203.
12. Nashimoto Y, Mukomoto R, Imaizumi T, et al. Electrochemical sensing of oxygen metabolism for a three-dimensional cultured model with biomimetic vascular flow. *Biosens Bioelectron*. 2023;219:114808.

13. Clark L. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *T Am Soc Art Int Org.* 1956;II:41-48.
14. Damińska S, Biernat JF, Bilewicz R. Oznaczanie tlenu - od metody Winklera do czujników enzymatycznych. *Wiadomości chemiczne.* 2015;(69):9-10.
15. Thorseth MA, Tornow CE, Tse ECM, Gewirth AA. Cu complexes that catalyze the oxygen reduction reaction. *Coord Chem Rev.* 2013;257(1):130-139.
16. Anderson AB, Albu TV. Catalytic Effect of Platinum on Oxygen Reduction An Ab Initio Model Including Electrode Potential Dependence. *J Electrochem Soc.* 2000;147(11):4229.
17. Santoro C, Serov A, Stariha L, et al. Iron based catalysts from novel low-cost organic precursors for enhanced oxygen reduction reaction in neutral media microbial fuel cells. *Energy Environ Sci.* 2016;9(7):2346-2353.
18. Dou J, Lu X, Wang D, Wang X, Qi W. Design and synthesis of Co@NiSe catalyst for efficient 2e⁻ ORR in neutral electrolyte: Effect of electronic structure engineering. *Carbon Trends.* 2024;15:100365.
19. Jasinski R. A New Fuel Cell Cathode Catalyst. *Nature.* 1964;201(4925):1212-1213.
20. Collman JP, Bencosme CS, Durand RR, Kreh RP, Anson FC. Mixed-metal face-to-face porphyrin dimers. *J Am Chem Soc.* 1983;105(9):2699-2703.
21. Tsuda M, Sy Dy E, Kasai H. Comparative study of O₂ dissociation on various metalloporphyrins. *J Chem Phys.* 2005;122(24):244719.
22. Shi Z, Zhang J. Density Functional Theory Study of Transitional Metal Macrocyclic Complexes' Dioxygen-Binding Abilities and Their Catalytic Activities toward Oxygen Reduction Reaction. *J Phys Chem C.* 2007;111(19):7084-7090.
23. Sun S, Jiang N, Xia D. Density Functional Theory Study of the Oxygen Reduction Reaction on Metalloporphyrins and Metallophthalocyanines. *J Phys Chem C.* 2011;115(19):9511-9517.
24. Voet D, Voet J. *Biochemistry.* John Wiley & Sons; 2004.
25. Johnston CM, Piela P, Zelenay P. Transition metal/polymer catalysts for O₂ reduction. In: Vielstich W, Lamm A, Gasteiger HA, Yokokawa H, eds. *Handbook of Fuel Cells.* 1st ed. Wiley; 2010.
26. Malko D, Kucernak A, Lopes T. In situ electrochemical quantification of active sites in Fe-N/C non-precious metal catalysts. *Nat Commun.* 2016;7(1):13285.
27. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev.* 1996;96(7):2563-2606.
28. Zhou Q, Li CM, Li J, Cui X, Gervasio D. Template-Synthesized Cobalt Porphyrin/Polypyrrole Nanocomposite and Its Electrocatalysis for Oxygen Reduction in Neutral Medium. *J Phys Chem C.* 2007;111(30):11216-11222.
29. Mezour MA, Cornut R, Hussien EM, Morin M, Mauzeroll J. Detection of Hydrogen Peroxide Produced during the Oxygen Reduction Reaction at Self-Assembled Thiol-Porphyrin Monolayers on Gold using SECM and Nanoelectrodes. *Langmuir.* 2010;26(15):13000-13006.

30. Li M, Ornelas IM, Liu W, et al. Improved Potentiometric and Optic Sensitivity of Polyaniline Film to Dissolved Oxygen by Incorporating Iron-Porphyrin. *Electroanalysis*. 2015;27(6):1427-1435.
31. Saravia LPH, Anandhakumar S, Parussulo ALA, et al. Development of a tetraphenylporphyrin cobalt (II) modified glassy carbon electrode to monitor oxygen consumption in biological samples. *J Electroanal Chem*. 2016;775:72-76.
32. Kappalakandy Valapil K, Filipiak MS, Rekiel W, et al. Fabrication of ITO microelectrodes and electrode arrays using a low-cost CO₂ laser plotter. *Lab Chip*. 2023;23(17):3802-3810.
33. Valapil- Kappalakandy K. *ITO Microelectrodes and Microelectrode Arrays for the Analysis of Cell Cultures and Biomedical Applications*. Praca Doktorska. Instytut Chemii Fizycznej PAN; 2024.
34. Sharma S, Ganeshan SK, Pattnaik PK, Kanungo S, Chappanda KN. Laser induced flexible graphene electrodes for electrochemical sensing of hydrazine. *Mater Lett*. 2020;262:127150.
35. Dornhof J, Kieninger J, Rupitsch SJ, Weltin A. Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip (2019–2024). *Lab Chip*. 2025;25(5):1149-1168.
36. Gerardo D, Houeix Y, Romero FJ, et al. Optimization of dry laser-induced graphene (LIG) electrodes for electrocardiography (ECG) signals monitoring. *Appl Phys A*. 2024;130(3):197.
37. Tang Y, Moreira GA, Vanegas D, Datta SPA, McLamore ES. Batch-to-Batch Variation in Laser-Inscribed Graphene (LIG) Electrodes for Electrochemical Sensing. *Micromachines*. 2024;15(7):874.
38. Temiz Y, Ferretti A, Leblebici Y, Guiducci C. A comparative study on fabrication techniques for on-chip microelectrodes. *Lab Chip*. 2012;12(22):4920.
39. Zamani M, Klapperich CM, Furst AL. Recent advances in gold electrode fabrication for low-resource setting biosensing. *Lab Chip*. 2023;23(5):1410-1419.

3. Warstwy przeciwpowrostowe w analizie elektrochemicznej w hodowli komórkowej

3.1. Wprowadzenie

Długoterminowe pomiary elektrochemiczne w hodowlach komórkowych mogą stanowić wyzwanie ze względu na pojawiający się problem tzw. biofoulingu^[1]. Pożywka hodowlana jest złożona z wielu białek, peptydów, lipidów i polisacharydów^[2], które są łatwo adsorbowane na powierzchni elektrody poprzez niespecyficzne wiązania, a wydłużający się czas pomiaru prowadzi do tworzenia nieprzepuszczalnej warstwy na powierzchni czujnika negatywnie wpływając na jego charakterystykę analityczną^[3]. Warunki dynamiczne/przepływowe, np. w układach mikroprzepływowych, zmniejszają problem biofoulingu, jednak w warunkach statycznych zjawisko to jest bardziej widoczne. Akumulacja niepożądanych cząsteczek na powierzchni czujnika elektrochemicznego może prowadzić do spadku czułości i powtarzalności, zmniejszając jego długoterminową stabilność, a tym samym prowadzić do pojawienia się znacznego szumu tła, który może wpływać na oznaczanie docelowej substancji, szczególnie przy niskich stężeniach^[4,5].

Istnieje kilka metod zapobiegania trwałej adsorpcji na powierzchni elektrod, które zmniejszają lub eliminują warstwę adsorbatu na elektrodzie. Między innymi jest to dodatek do analizowanej próbki rozpuszczalników organicznych lub środków powierzchniowo czynnych^[6], które zwiększają rozpuszczalność produktów reakcji pokrywających powierzchnię elektrody. W celu desorpcji cząsteczek zaadsorbowanych na elektrodzie często wykorzystywane są również techniki elektrochemiczne. Aby usunąć z powierzchni elektrody pracującej niepożądane cząsteczki można przyłożyć do elektrody pojedynczy puls katodowy/anodowy lub sekwencję pulsów^[1,7,8]. Powstawanie tlenu cząsteczkowego w wyniku przyłożenia dodatnich potencjałów, może spowodować utlenianie zaadsorbowanej warstwy, ale jednocześnie wpłynąć negatywnie na komórki. Wspomniane metody mogą być również szkodliwe w przypadku powierzchni modyfikowanych katalizatorami chemicznymi lub biologicznymi, powodując ich degradację lub fizyczne oderwanie. Istnieje prawdopodobieństwo, że rozkład katalizatora może doprowadzić do niepożądanych reakcji ubocznych prowadząc do zaburzenia środowiska hodowli komórkowej np. poprzez zmianę pH, a w efekcie działać szkodliwie na komórki.

Ze względu na wrażliwość komórek na bodźce mechaniczne i biochemiczne najbardziej odpowiednią metodą ochrony przeciwpowrostowej (ang. *antifouling*) są pasywne bariery w postaci powłoki (warstwy) na powierzchni elektrod, które zapobiegają niepożądaną adsorpcji na ich powierzchni obecnych w badanej próbce

cząsteczek. Warstwy ochronne minimalizują interakcje z potencjalnie szkodliwymi substancjami poprzez zmianę hydrofobowości/hydrofilowości, minimalizację oddziaływań elektrostatycznych lub oddziaływań sterycznych^[9,10]. Dobrze dobrana powłoka powinna być również biokompatybilna, naturalnie obojętna i nie reagować ze środowiskiem próbki. Ze względu na różnorodność próbek biologicznych proces dobrania odpowiedniej warstwy ochronnej powinien być starannie przeprowadzony.

Wykorzystanie polimerów, takich jak glikol polietylenowy (PEG), polioksyetylen (PEO), polyortofenyloediamina, kwas polimlekowy (PLLA), Nafion® czy związki zwitterjonowe, jako warstw przeciwporostowych znane jest od dziesięcioleci^[9]. Charakteryzują się niską toksycznością, biokompatybilnością, niskim kosztem oraz łatwością funkcjonalizacji elektrod. Jedną z najczęściej wybieranych warstw ochronnych są warstwy oparte na PEG i jego pochodnych, które są szeroko wykorzystywane w zastosowaniach biomedycznych. PEG jest syntetycznym polimerem tlenku etylenu o zróżnicowanych długościach łańcucha polimerowego. Charakteryzuje go biokompatybilność oraz właściwości hydrofilowe, które wzrastają wraz z długością łańcucha^[4]. PEG o dłuższych łańcuchach polimerowych wykazuje również większe właściwości przeciwporostowe, niż związki o krótszych łańcuchach polimerowych^[11]. Mechanizm przeciwporostowy opiera się zarówno na oddziaływaniach sterycznych, jak i silnej warstwie hydratacyjnej, która powstaje przez związanie cząsteczki wody z każdą jednostką glikolu etylenowego w łańcuchu PEG^[12]. Istotną cechą PEG jest możliwość funkcjonalizacji grup końcowych, podobnie jak w przypadku polipeptydów. Związki PEG są uważane za „złoty standard” jako powłoki przeciwporostowe^[12].

Istotnym polimerem stosowanym w medycynie regeneracyjnej jako warstwy ochronne m.in. implantów jest PLLA. Jest to syntetyczny, biokompatybilny i biodegradowalny polimer^[13], który w porównaniu do stereoizomeru - PDLA, zapewnia wyższą stabilność chemiczną i odporność na degradację^[14]. PLLA charakteryzuje się również hydrofobowością^[15]. Niestety niekontrolowana degradacja PLLA, powoduje hydrolizę i zmianę lokalnego pH z powodu tworzenia kwaśnych produktów ubocznych^[16].

Podobne właściwości hydrofobowe wykazuje polichlorek winylu, który skutecznie zmniejsza adhezję białek^[17] i zapewnia długoterminową stabilność w próbkach krwi^[18]. Inny rodzaj mechanizmu przeciwporostowego wykazuje Nafion®, perfluorosulfonowany polimer^[8], który, gdy jest ujemnie naładowany w roztworach wodnych, może zapobiegać adsorpcji poprzez odpychanie elektrostatyczne^[19]. Z kolei polifenylenodiamina jest jednym z polimerów wykorzystywanych w czujnikach stosowanych do pomiarów *in vivo*^[20,21]. Charakteryzuje się permselektywnością,

pozwalając na swobodny przepływ cząsteczek tlenu oraz nadtlenu wodoru blokując cząsteczki o większej średnicy.

Jako warstwy ochronne wykorzystywane są również hydrożele o trójwymiarowej strukturze wytworzone w procesie kowalencyjnego sieciowania z naturalnych lub syntetycznych polimerów^[18]. Charakteryzują się właściwościami hydrofilowymi. Pokrycie elektrody przez hydrożele zapewnia nie tylko fizyczną barierę utrudniającą dostęp do powierzchni elektrody, ale również zapobiega adsorpcji poprzez siły hydratacji związanej warstwy wody^[22]. Hydrożele na bazie PEG i PVA są biokompatybilne^[12] i stabilne w roztworach biologicznych, a hydrożele poliakrylanowe mogą wykazywać odwracalne pęcznienie (wzrost objętości) wraz ze zmieniającą się odpowiedzią na bodziec (tj. pH i temperaturę) poprzez ich naładowane grupy funkcyjne^[23], umożliwiając oznaczanym cząsteczkom łatwą dyfuzję w spęczniałej warstwie żelu. Hydrożele często są wykorzystywane w inżynierii tkankowej.

Warto również zwrócić uwagę na naturalnie obojętne krzemianowe materiały zol-żel, które są biokompatybilne i charakteryzują się wyższą stabilnością mechaniczną i termiczną niż hydrożele^[24]. Pozwala to na szeroki zakres zastosowań m.in. w ochronie środowiska lub biomedycynie, gdzie membrany polimerowe i krzemionkowe znajdują powszechne zastosowanie ze względu na ich stabilność, biokompatybilność i łatwość aplikacji^[25]. Ze względu na wysoką porowatość, są one często wykorzystywane do immobilizacji enzymów w czujnikach. Zmianę porowatości warstw krzemianowych można uzyskać poprzez dodatek kationu tetrametyloamoniowego, ze względu na obecność uporządkowanych defektów^[26].

Często jako warstwa ochronna wykorzystywane są również białka, a szczególnie albumina surowicy bydlęcej (BSA)^[27]. BSA jest często stosowana jako biologiczny wzorzec zanieczyszczenia w testach stabilności elektrod, jego modyfikacja czujników za pomocą BSA w kontrolowanych warunkach pozwala zredukować szum tła i zmniejszyć adhezję komórek^[28]. Zakład się bowiem, że dalsza adsorpcja cząsteczek z roztworu zmieni sygnał tylko w niewielkim stopniu. Wadą tej metody jest proteoliza lub denaturacja BSA w określonych warunkach, zmniejszając skuteczność przeciwpoporostową^[29], a także częściowe blokowanie powierzchni ze względu na mniejszą średnicę cząsteczek niż cząsteczka BSA^[30]. Struktura zaadsorbowanego BSA i rozkład ładunku na powierzchni elektrod zależy również od pH roztworu, co może wpływać na właściwości przeciwpoporostowe i stabilność elektrod^[31,32].

W ostatnich latach, również materiały węglowe, takie jak grafen, nanorurki i nanowłókna węglowe^[33,34] czy arkusze grafitowe^[35], zaczęto wykorzystywać jako

materiały przeciwporostowe ze względu na ich rozwiniętą powierzchnię, właściwości elektrokatalityczne i przewodność elektryczną^[1,36]. Szczególnie wyróżniającym materiałem jest nanodiamant, który podobnie do diamentu ma wysoką stabilność elektrochemiczną, ze względu na wiązania sp^3 ^[37,38]. Jego niska toksyczność i możliwość funkcjonalizacji umożliwia potencjalne wykorzystanie w badaniach biomedycznych^[39].

Jak wspomniano wcześniej, ocena powłoki przeciwporostowej jest kluczowa w procesie opracowywania czujników. Do każdego zastosowania należy indywidualnie dobrać mechanizm ochronny. W przypadku czujników wykorzystywanych w hodowli komórkowej, najlepszym podejściem jest zastosowanie warstw opartych na właściwościach odpychających. Chociaż powłoka przeciwdrobnoustrojowa uwalniająca substancje aktywne (np. chlorheksydyna/antybiotyki/tlenek azotu/srebro) jest doskonałym podejściem do wszczepialnych urządzeń medycznych, proces zabijania istniejących drobnoustrojów w środowisku hodowli komórkowej może mieć niepożądane skutki^[40,41]. Również warstwy ochronne oparte na fotoaktywnych nanocząstkach tlenków metali nie są odpowiednie ze względu na efekty uboczne w postaci powstawania reaktywnych form tlenu (ROS), które są wysoce szkodliwe dla komórek^[42,43].

Podczas analizy wyboru odpowiedniej warstwy ochronnej należy wziąć pod uwagę warunki pomiarowe próbek rzeczywistych, takie jak temperatura, pH i złożoność składu próbki analitycznej. W badaniach biologicznych powszechnie stosuje się metody inkubacji/płukania, pozwalające na ocenę długoterminowej stabilności czujnika. Zazwyczaj ocena stabilności warstwy przeciwporostowej wymaga dodania do analizowanego roztworu próbника redoks, jak w przypadku badania stabilności warstw przeciwporostowych w obecności albuminy z dodatkiem próbника redoks $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ ^[44] lub FcMeOH w celu zbadania wpływu różnej porowatości elektrod w obecności albuminy lub fibrynogenu^[45]. Możliwa jest również ocena stabilności czujnika poprzez inkubacje w pożywkach biologicznych o złożonym składzie np. w obecności BSA, a następnie pomiar czułości dedykowanego czujnika w ciągu kilku dni inkubacji. Metoda ta jest zwykle stosowana do oceny bioczujników opartych na unieruchomionych enzymach^[46]. Innym sposobem jest ocena stabilności warstw przeciwporostowych poprzez unieruchomienie katalizatora na powierzchni elektrod przez pokrycie go warstwą ochronną. Zaletą tej metody jest stabilność warstwy, ze względu na brak lokalnej zmiany pH czy dodatkowych reakcji ubocznych. Jednak utrudniona jest ocena możliwości dyfuzji w warstwie ochronnej cząsteczki do powierzchni elektrody.

Badania przedstawione w niniejszym rozdziale zostały przeprowadzone we współpracy z mgr. inż. Zuzanną Zambrowską. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie ACS OMEGA:

E. Jarosińska, Z. Zambrowska, E. Witkowska-Nery, Methods of Protection of Electrochemical Sensors against Biofouling in Cell Culture Applications. ACS Omega 2024, 9, 4572-4580

3.2. Materiały i metody

3.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

- Waga analityczna (Mettler Toledo),
- Myjka ultradźwiękowa (EMAG Technologies),
- pH-metr (Mettler Toledo),
- Mieszadło z funkcją grzania (IKA),
- Wyrząsarka typu vortex (bioSan),
- Grawerka laserowa CO₂ (GCC),
- Pipety automatyczne (Eppendorf),
- Inkubator HERA-Cell 150 (Biogenet),
- Komora laminarna (ThermoFisher),
- Odwrócony mikroskop fluorescencyjny (Nikon Eclipse Ti-S),
- Czytnik płytek wielodołkowych (Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments),
- Hemacytometr (Countess II Cell Counter).

3.2.2. Materiały

- Wkłady do ołówka mechanicznego Pentel Ain Stein 2B 0,2 (Pentel Co.Ltd.),
- Elektrody drukowane metodą sitodruku (BVT Technologies),
- Elektrody z węgla szklanego (Mineral),
- Płytki ITO (Delta Technologies),
- Szklane kapilary borokrzemianowe (ø 1,6 mm) (Science Product),
- Klej srebrny (Pelco Silver Paint 16062, Ted Pella),
- Drut miedziany,
- Papier ścierny o gradacji 1200, 800, 600,
- Butelki do hodowli komórkowej (Sarstedt),
- Płytki 96-dołkowa (Greiner Bio-One),

- Płytki hodowlane TC Dish 35 (Sarstedt),
- Płytki do liczenia komórek (ThermoFisherScientific),
- Pipety serologiczne (Sarstedt),
- Probówki typu Falcon 15 ml (Sarstedt),
- Probówki typu Falcon 50 ml (Sarstedt),
- Probówki typu eppendorf (Bionovo),
- Końcówki do pipet (Gilson).

3.2.3. Odczynniki

Albumina surowicy bydlęcej (BSA), (Sigma Aldrich); Benacure 1173 (2-hydroksy-2-metylo-1-fenilo-1-propanon), bromowodorek poli-L-lizyny (Sigma Aldrich), chlorek trimetoksylilopropylu-N,N,N-trimetyloamoniowy (TMA) (>98%, Sigma Aldrich); dichlorometan (DCM) (Sigma Aldrich); etanol (99,8%, POCH); eter 2-nitrofenylooktylowy (>99%, Sigma Aldrich), eter diglicydowy poli(glikolu etylenowego) (PEGDE) (Sigma Aldrich); HEPES (>99,5%, Sigma Aldrich); hydroxymetylferrocene (abcr), kwas chlorowodorowy HCl (POCH); metakrylan hydroksyetylu (HEMA) (ABCR); metanol (>99. 8%, Sigma Aldrich); Nafion® (Sigma Aldrich); n-winylo-2-pirolidynon (Sigma Aldrich); o-fenilenodiamina (>98%, Sigma Aldrich); PBS pH 7,4 (ROTH); poli(chlorek winylu) (PVC) (Sigma Aldrich); syryngaldazyna (99%, Sigma-Aldrich); tetrahydrofuran (>99. 8%, POCH); tetrametoksylan (TMOS) (POCH); węglan monometoksy-PEG-nitrofenylu (Sigma Aldrich); wodorotlenek potasu KOH (>99,99%, Sigma Aldrich); wodorowęglan amonu (Chempur).

Wszystkie eksperymenty zostały wykonane używając standardowego szkła laboratoryjnego stanowiącego wyposażenie laboratorium. Wykorzystane odczynniki charakteryzowały się czystością analityczną i były przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta.

Do sporządzania wodnych roztworów wzorcowych oraz buforowych wykorzystywano wodę demineralizowaną z systemu Sartorius Arium Comfort I, o rezystancji równej 18.2 MΩ · cm.

3.3. Metody badań

3.3.1. Pomiary elektrochemiczne

Wszystkie pomiary elektrochemiczne przeprowadzono za pomocą potencjostatu Autolab PGSTAT30, kontrolowanego przez oprogramowanie GPES (Eco Chemie)

oraz potencjostatu PalmSens 4 kontrolowanego przez oprogramowanie PSTrace (wersja 5.8). Pomiary wykonano w układzie trójelektrodowym składającym się z wybranej elektrody pracującej, elektrody odniesienia Ag/AgCl (1 M KCl) (IJ Cambria Scientific Ltd.) o średnicy 2 mm oraz drutu platynowego o średnicy 0,5 mm (Mennica Metale Sp. z o.o.) jako elektrody pomocniczej.

3.3.2. Przygotowanie elektrod

Do badań przedstawionych w niniejszym rozdziale wykorzystano elektrody wykonane z węgla szklatego (GCE, ang. *glassy carbon electrode*), elektrody z grafitu ołówkowego (GPE, ang. *pencil graphite electrode*, czasem nazywane LPE ang. *lead pencil electrode*), elektrody drukowane metodą sitodruku (SPE, ang. *screen printed electrode*) oraz elektrody ITO.

Elektrody z węgla szklatego przygotowano poprzez polerowanie powierzchnię elektrod przy użyciu Al_2O_3 o ziarnistości 1 μm , 0,3 μm i 0,05 μm a następnie opłukanie w wodzie dejonizowanej i wysuszenie w temperaturze otoczenia.

Elektrody SPE zostały przygotowane poprzez czyszczenie w 0,5 M roztworze H_2SO_4 oraz przyłożeniu potencjału 1,5 V w roztworze Na_2CO_3 przez 2 min.

Elektrody ITO zostały przygotowane poprzez wycięcie ploterem laserowym na szklanych płytkach pokrytych ITO (~ 130 nm, $R_s = 5\text{--}15$ Ω/sq), a następnie oczyszczono poprzez poddanie elektrod zanurzonych w roztworze (1) izopropanolu oraz (2) wody zdemineralizowanej działaniu ultradźwięków przez 15 min.

Elektrody ołówkowe przygotowano poprzez umieszczenie wkładu do ołówka mechanicznego Pentel Ain Stein 2B 0,2 w szklanej kapilarze ($\varnothing$ 1,6 mm) i jego zabezpieczenie poprzez podgrzanie jednego końca kapilary z wykorzystaniem palnika Bunsena. Na drugim końcu kapilary, do ołówka został przyklejony miedziany drut za pomocą przewodzącego kleju srebrnego, a następnie zanurzony w gorącym kleju w celu ustanowienia stabilnego połączenia elektrod. Powierzchnię elektrod polerowano papierem ściernym o gradacji 1200, 800, 600, a następnie przy użyciu papieru do kopiowania. Przygotowane elektrody scharakteryzowano poprzez wstępny pomiar CV w roztworze FcMeOH, a następnie elektrody o podobnej charakterystyce prądowo-napięciowej zostały wypolerowane przy użyciu Al_2O_3 o ziarnistości 1 μm , 0,3 μm i 0,05 μm .

3.3.3. Modyfikacja elektrod

W celu modyfikacji elektrod syryngaldazyną, elektrody zostały zanurzone w roztworze 0,5 mg/ml syryngaldazyny w etanolu na 60 s, a następnie pozostawione do suszenia w temperaturze otoczenia⁴⁷.

W celu modyfikacji elektrod warstwą ochronną, elektrody modyfikowano poprzez:

- **Nafion[®]** - (1) nakropienie 5 μ l Nafionu na powierzchnię elektrody i pozostawienie do wyschnięcia w temperaturze otoczenia; (2) trzykrotnie zanurzenie elektrody w 5% roztworze Nafionu i suszenie w temperaturze 120°C przez 30 min^[44,48,49].
- **Poli-o-fenylenodiamina** - zanurzenie elektrody w 300 mM roztworze o-fenylenodiaminy (OPD) w roztworze buforowym PBS pH 7,4, następnie przyłożenie napięcia 700 mV vs Ag/AgCl 3 M KCl przez 15 min^[50].
- **PVC** - nakropienie roztworu polimeru na powierzchnię elektrody (33 mg PVC i 66 mg eteru 2-nitrofenylooktylowego w 500 μ l THF) na powierzchnię elektrody i pozostawienie do wyschnięcia w temperaturze otoczenia. Stosunek polimeru do plastyfikatora został wybrany na podstawie składu elektrod jonoselektywnych^[51].
- **PLLA** - nakropienie roztworu polimeru (0,1 g PLLA w 3 ml DCM zmieszano z 1 g NH_4HCO_3) na powierzchnię elektrody, i umieszczenie elektrody w wodzie destylowanej o temperaturze 85°C na 5 min, a następnie w wodzie destylowanej o temperaturze otoczenia na 20 min. w celu wygaszenia reakcji. Elektrody pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej^[52].
- **PEDGE** - nakropienie roztworu na powierzchnię elektrody (100 mg PEGDE, 10 μ l glicerolu w 990 μ l wody destylowanej) i suszenie elektrody w temperaturze 55°C przez 2h^[53].
- **poliHEMA** - nakropienie roztworu wyjściowego HEMA na powierzchnię elektrody, a następnie umieszczenie pod lampą UV (365 nm) i naświetlanie przez 5 min. Roztwór wyjściowy wykonano poprzez zmieszanie HEMA z n-winylo-2-pirolidynonem w stosunku molowym 3:2. Roztwór odtleniono z użyciem argonu. Następnie dodano 50 μ l Benacure 1173 (2-hydroksy-2-metylo-1-fenilo-1-propanon)^[54].
- **TMOS** - nakropienie roztworu wyjściowego na powierzchnię elektrody i pozostawienie do wyschnięcia przez 24h. Roztwór wyjściowy przygotowano

poprzez zmieszanie 62,5 μl związku TMOS, 15,6 μl wody destylowanej oraz 3,4 μl 0,04 M HCl, i poddanie mieszaniny działaniu ultradźwięków na lodzie przez 20 minut. Po tym czasie pobrano 25 μl mieszaniny i dodano do niej 25 μl roztworu buforowego o pH równym 5,0. Następnie ponownie pobrano 25 μl nowej mieszaniny, dodano 225 μl roztworu buforowego o pH równym 5,0. Za każdym razem nową mieszaninę poddawano działaniu ultradźwięków na lodzie przez 3 min. Następnie pobrano 12,5 μl przygotowanego roztworu i 112,5 μl wody destylowanej, dokładnie wymieszano za pomocą wstrząsarki typu vortex.

- **TMA/TMOS** - nakropienie roztworu (270 μl TMOS, 30 μl TMA, 5 μl 11 M HCl, 185 μl metanolu w 75 μl wody destylowanej) na powierzchnię elektrody i pozostawienie do wyschnięcia w temperaturze otoczenia^[55].
- **BSA** - (1) nakropienie 10 μl roztworu (150 mg BSA, 100 mg PEGDE, 10 μL glicerolu w 990 μl wody destylowanej) na powierzchnię elektrody i suszenie w temperaturze 55°C przez 2h, (2) inkubację elektrody w roztworze 100 mg/ml BSA przez 2h^[32].
- **PLL-PEG** - nakropienie 10 μl roztworu wyjściowego na powierzchnię elektrody i pozostawienie do wyschnięcia przez 24h. Roztwór wyjściowy przygotowano poprzez rozpuszczenie 5 mg bromowodoru poli-L-lizyny w 0,1 ml 50 mM roztworu buforowego boranu sodu (SBB) o pH 8,5. Następnie dodano 0,2 g węglanu monometoksy-PEG-nitrofenylu. Reakcję prowadzono przez 6h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną przefiltrowano przez filtr o wielkości porów 0,45 μm ^[56].
- **Nanodiament** - nakropienie 5 μl roztworu (10 μl TMA/TMOS w 1 ml H₂O z 3 mg ND) na powierzchnię elektrody i pozostawienie do wyschnięcia na 24h^[57].

3.3.4. Hodowla komórkowa

W badaniu wykorzystano ludzką linię komórkową raka szyjki macicy – HeLa z amerykańskiej kolekcji hodowli komórkowych (ATCC, ang. *American Type Culture Collection*, Manassas, USA). Komórki hodowano jako standardową monowarstwę w pożywce DMEM o niskiej zawartości glukozy (Instytut Immunologii i Techniki Doświadczalnej, Wrocław, Polska), wzbogaconej o 10% FBS (Gibco), oraz streptomycynę [10 000 U ml⁻¹], penicylinę [10 mg ml⁻¹] 1% v/v (Sigma-Aldrich). Hodowle prowadzono w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po osiągnięciu przez komórki konfluencji na poziomie 80-90%, przeprowadzano procedurę pasażu.

Do odklejenia komórek od powierzchni używano 0,25% roztworu Trypsyna-EDTA (Sigma-Aldrich).

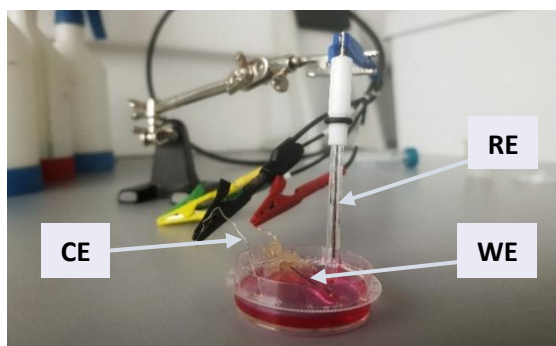
3.3.5. Metody oceny proliferacji i żywotności komórek

W celu określenia proliferacji komórek wykonano test z wykorzystaniem odczynnika AlamarBlue (Bio-Rad), zgodnie z protokołem producenta. Przeprowadzono trzy kontrole w trzech powtórzeniach: (1) komórki z alamarBlue (kontrola pozytywna), (2) komórki z 1% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) (kontrola negatywna) oraz (3) sama pożywka z barwnikiem (ślepa próba). Test przeprowadzono z wykorzystaniem płytki 96-dołkowej.

Na każdy dołek (w sześciu powtórzeniach) naniesiono 20-30 μ l warstwy przeciwporostowej i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 48h. Po tym czasie na każdy dołek pokryty warstwą ochronną wysiano komórki linii HeLa (około 7500 komórek na dołek), następnie płytkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 4h. Gęstość zawiesiny komórkowej określono za pomocą hemacytometru. Intensywność fluorescencji mierzono w pożywce hodowlanej wolnej od czerwieni fenolowej (w celu wyeliminowania fluorescencji tła), z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych Synergy HTX Multi-Mode Reader przy długości fali wzbudzenia 590 nm (filtr 590/20) i długości fali emisji 560 nm (filtr 560/20).

3.3.6. Układ pomiarowy

Układ pomiarowy w hodowli komórkowej składał się z szalki hodowlanej na której zainstalowano zmodyfikowaną elektrodę z grafitu ołówkowego (GPE). W celu umieszczenia elektrod pracujących, wypalono mały otwór z boku szalki hodowlanej za pomocą gorącego metalowego pręta, elektrodę umieszczono wewnątrz i ustabilizowano z wykorzystaniem kleju na gorąco. W badaniach wykorzystano linię komórkową HeLa, która została wysiana na szalki hodowlane. Po osiągnięciu przez komórki konfluencji na poziomie 80-90%, przeprowadzano procedurę pasażu, podobnie jak w Rozdziale 3.3.4. Elektroda pracująca znajdowała się w hodowli komórkowej przez cały czas trwania eksperymentu, elektroda odniesienia i przeciwelektroda były umieszczane w pożywce hodowlanej tylko na czas pomiarów (Rysunek 3.1.).



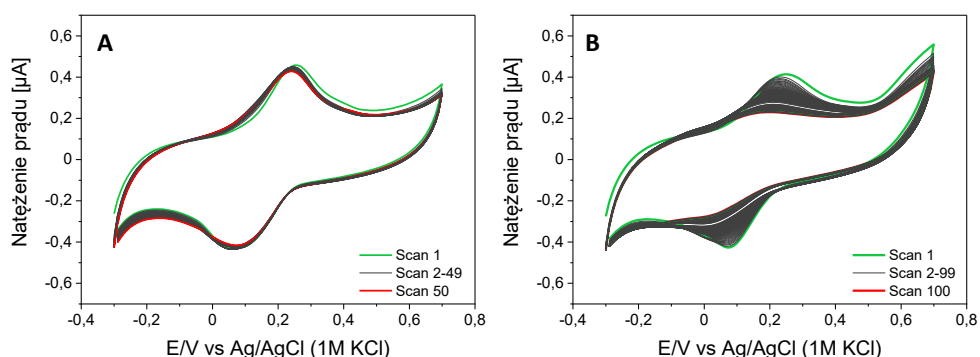
Rysunek 3.1. Układ pomiarowy z wykorzystaniem zmodyfikowanych elektrod GPE. WE – elektroda pracująca, RE – elektroda odniesienia, CE – przeciwelektroda.

3.4. Wyniki i dyskusja

Celem badań zaprezentowanych w niniejszym rozdziale było zidentyfikowanie warstwy przeciwporostowej, która mogłaby posłużyć jako warstwa ochronna w długoterminowych pomiarach przeprowadzonych w hodowli komórkowej, ponieważ tak jak opisano wcześniej, niespecyficzna adsorpcja związków występujących w pożywce hodowlanej na powierzchni elektrod może prowadzić do zmniejszenia czułości i selektywności czujników, a także ich stabilności.

Na podstawie literatury, wybrano, a następnie przebadano ponad 10 modelowych związków reprezentujących różne grupy o właściwościach przeciwporostowych pod kątem modyfikacji powierzchni elektrod. Mikroczujniki elektrochemiczne wykorzystywane w pomiarach w hodowlach komórkowych są oparte na metalach szlachetnych lub węglu^[58], dlatego w niniejszych badaniach skupiono się na modyfikacjach powierzchni węglowych.

Jako modelowy związek warstwy katalizatora wybrano syryngaldazynę, ze względu na jej łatwą adsorpcję na powierzchniach węglowych oraz charakterystyczną liniową zależność maksimum piku redukcji/utlenienia w zależności od pH roztworu⁴⁷. Warstwa syryngaldazyny zachowuje stabilność na powierzchni elektrody w roztworach buforowych, jednak szybko ulega degradacji w roztworach o bardziej złożonym składzie, zapewniając doskonałe narzędzie do badania stabilności warstw przeciwporostowych (Rysunek 3.2.). Dodatkowo wpływ potencjału maksimum piku od pH umożliwia badanie wpływu warstwy przeciwporostowej na lokalne warunki pomiarowe na elektrodzie.

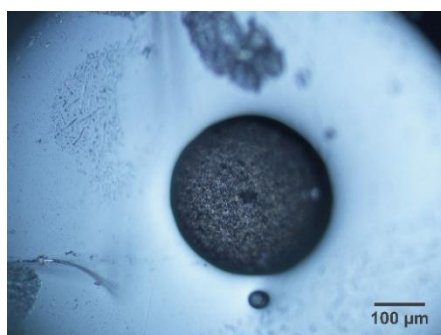


Rysunek 3.2. Woltamperogram cykliczny (CV) otrzymany z wykorzystaniem GCE zmodyfikowanej syryngaldazyną w roztworze buforowym o pH 7,4 (A) i pożywce do hodowli komórkowych (B).

3.4.1. Wybór elektrod

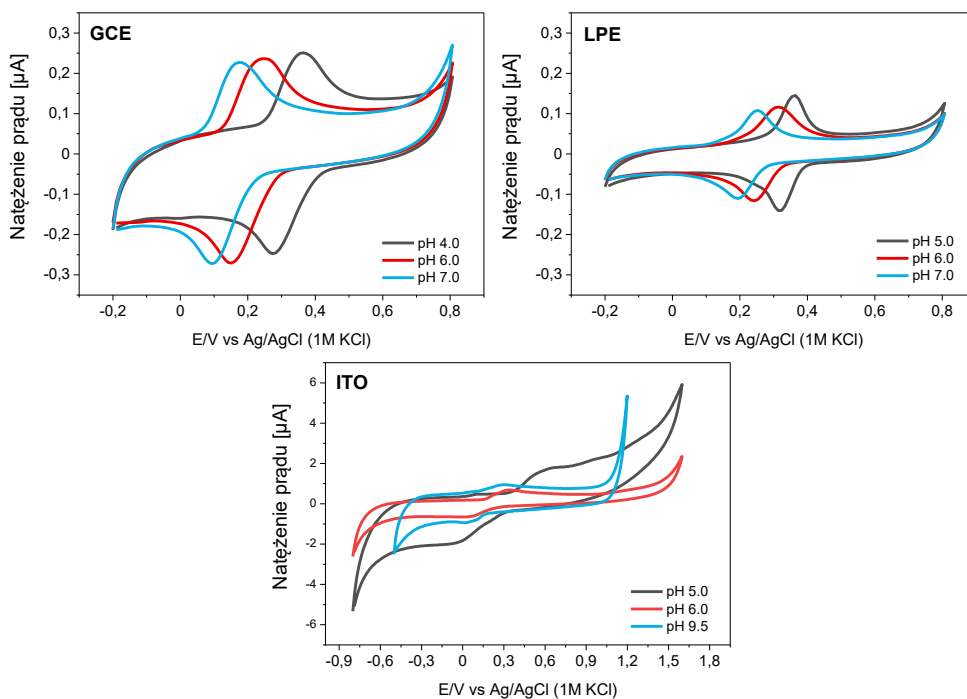
Pierwszym krokiem opisywanych badań była modyfikacja elektrod syryngaldazyną, a następnie warstwą ochronną. Na początku w tym celu wykorzystano standardowe komercyjne elektrody z węgla szklanego ($\phi = 3$ mm), ze względu na ich powszechną dostępność oraz łatwą adsorpcję syryngaldazyny na powierzchniach węglowych. Niestety podczas modyfikacji powierzchni zaobserwowano pęknięcia, nierównomierne rozłożenie warstwy oraz brak przyczepności niektórych badanych materiałów. Z tego względu zdecydowano się powtórzyć część badań na elektrodach o mniejszej powierzchni.

Kolejne badania przeprowadzono na komercyjnych, wielokanałowych elektrodach węglowych wykonanych metodą sitodruku (SPE) o średnicy 1 mm, elektrodach ITO oraz na elektrodach z grafitu ołówkowego (GPE) (Rysunek 3.3.).



Rysunek 3.3. Elektroda grafitowa Skala 100 μm .

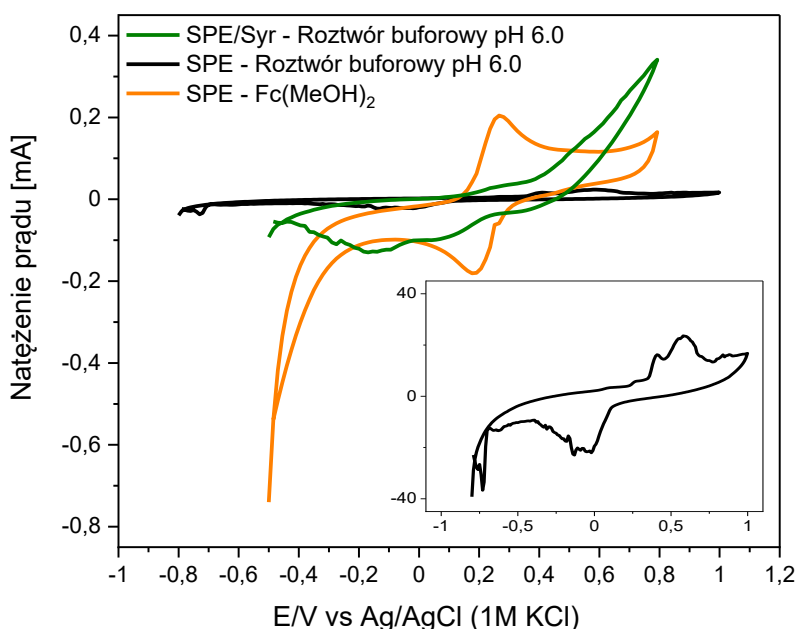
Spośród wymienionych elektrod, tylko wykorzystanie elektrod GPE pozwoliło na uzyskanie powtarzalnego, stabilnego sygnału pochodzący od syryngaldazyny, oraz charakterystyczną zależność przesunięcia maksimum pików od pH roztworu (Rysunek 3.4.). Materiałem, który zastosowano jako materiał elektrodowy był wysokiej jakości grafit, umieszczony w szklanej kapilarze. Elektrody grafitowe wyróżniają się wysoką stabilnością chemiczną i mechaniczną, zapewniając dobrą czułość i powtarzalność. Charakteryzują się również niższym prądem tła umożliwiając analizę niskich stężeń i małych objętości bezpośrednio w próbkach rzeczywistych^[59,60].



Rysunek 3.4. Woltamperogram cykliczny otrzymany z wykorzystaniem elektrod GCE, LPE oraz ITO zmodyfikowanych warstwą syryngaldazyny w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego o różnych wartościach pH. Szybkość zmian potencjału: 100 mV/s.

Przeprowadzone pomiary metodą CV z wykorzystaniem elektrod ITO pokrytych warstwą syryngaldazyny nie pozwoliły na uzyskanie tak powtarzalnych wyników. Choć sygnał pochodzący od syryngaldazyny był widoczny na zarejestrowanych woltamperogramach, nie zauważono charakterystycznego przesunięcia maksimum pików w stronę niższej wartości potencjału podczas pomiarów w roztworach buforowych. Podobnie wykorzystanie SPE (Rysunek 3.5.), nie pozwoliło na otrzymanie stabilnej warstwy syryngaldazyny. Dodatkowe czyszczenie elektrod

z wykorzystaniem H_2SO_4 i Na_2CO_3 nie przyniosło oczekiwanych rezultatów. Prawdopodobnie dodatkowy sygnał pochodził od obecnych na elektrodzie zanieczyszczeń pochodzących z elektroaktywnych składników pasty, które oddziałują z syryngaldazyną. Takie zanieczyszczenia są powszechne w tuszach węglowych SPE, jednak zwykle nie mają one tak dużego wpływu na wynik końcowy^[59]. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano elektrody grafitowe.

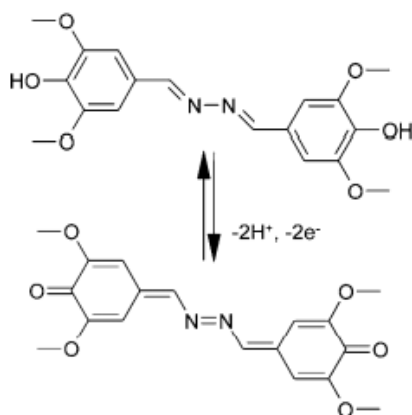


Rysunek 3.5. Woltamperogramy cykliczne otrzymane z wykorzystaniem elektrody SPE niemodyfikowanej w roztworze buforowym o pH 6,0, w roztworze $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ oraz SPE zmodyfikowanych warstwą syryngaldazyny w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego o pH 6,0. Inset przedstawia pomiar dla SPE zmodyfikowanych warstwą syryngaldazyny w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego o pH 6,0. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s.

3.4.2. Ocena stabilności wybranych warstw przeciwpoporostowych

W celu określenia stabilności wybranych warstw przeciwpoporostowych, a także ich możliwości wykorzystania w długoterminowych badaniach w hodowli komórkowej, przeprowadzono pomiar metodą woltamperometrii cyklicznej w roztworach buforowych o różnym pH, z wykorzystaniem elektrod LPE zmodyfikowanych syryngaldazyną, a następnie warstwą ochronną. Syryngaldazyna ulega odwracalnej jednoetapowej reakcji elektrodowej z teoretyczną zmianą potencjału formalnego o 59 mV na jednostkę pH w temperaturze 25 °C (Rysunek 3.6.). To specyficzne położenie pików utleniania i redukcji syryngaldazyny w roztworach buforowych

o różnym pH wraz z kształtem woltamperogramów pozwoliło ocenić wpływ złożonego roztworu, jak pożywka komórkowa na poszczególne materiały przeciwporostowe i ich wpływ na modelowy związek redoks aktywny użyty do modyfikacji elektrody. W badaniu przetestowano jedenaście różnych materiałów, w tym polimery, hydrożele, materiały zol-żel, białka i nanomateriały węglowe.



Rysunek 3.6. Mechanizm jednoetapowej reakcji syryngaldazyny.

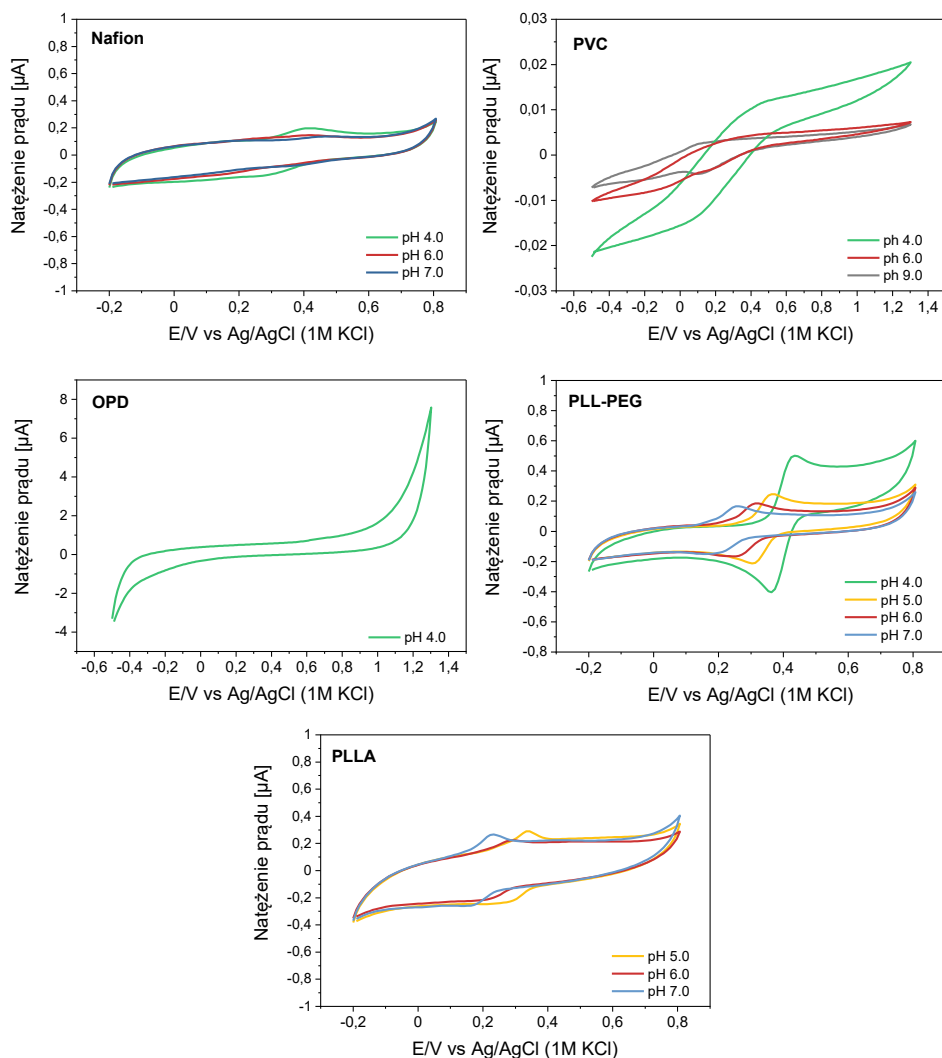
Testy cytotoksyczności pozwalają na ocenę żywotności komórek i ich aktywności metabolicznej i są wykorzystywane w badaniach przesiewowych leków przeciwnowotworowych. Potencjalne wykorzystanie czujników elektrochemicznych w testach cytotoksyczności i możliwość monitorowania metabolitów w czasie rzeczywistym wymaga zastosowania warstwy przeciwporostowej, aby utrzymać stabilność czujnika w całym czasie pomiaru. Leki cytostatyczne mogą zarówno powodować zatrzymanie cyklu komórkowego, jak i modyfikować metabolizm komórkowy. W przypadku śmierci komórki o morfologii nekrotycznej sygnał jest obserwowany dość szybko, natomiast często efekt cytostatyczny jest obserwowany po dłuższym czasie inkubacji komórek np. w przypadku testu z wykorzystaniem dehydrogenazy mleczanowej. Dłuższa inkubacja może wzmacniać efekt cytotoksyczny leków, dlatego w niektórych przypadkach ważna jest wydłużona inkubacja komórek z roztworem leku⁶¹. Z tego względu założono, że poszukiwana warstwa przeciwporostowa powinna być stabilna w środowisku hodowli komórkowej, co najmniej 3 tygodnie i przez taki czas prowadzono badania oceny obecności sygnału syryngaldazyny z wykorzystaniem metod elektrochemicznych. W pierwszym etapie przeprowadzono pomiar z wykorzystaniem wszystkich elektrod modyfikowanych w roztworach buforowych, następnie elektrody inkubowano w medium komórkowym przez 3 tygodnie. W trakcie inkubacji tj. po 3h, po 24h, po

1 tygodniu, po 2 tygodniach oraz po 3 tygodniach obserwowano zmiany odpowiedzi syryngaldazyny w roztworach buforowych.

Pierwszą grupą związków którą przebadano były polimery (Rysunek 3.7.). Powierzchnię elektrody pokryto warstwą Nafionu z wykorzystaniem dwóch metod, jednak żadna z nich nie pozwoliła na utworzenie stabilnej warstwy. Zauważono, że jedynie metoda, w której Nafion nakropiono na powierzchnię elektrody pozwoliła uzyskać stabilną barierę fizyczną i zaobserwować na woltamperogramach zależne od pH piki zarówno redukcji jak i utleniania syryngaldazyny. Jednak nie uzyskano stabilnego sygnału, a intensywność pików malała z każdym kolejnym cyklem polaryzacji. Prawdopodobnie syryngaldazyna rozpuściła się podczas etapu modyfikacji warstwą ochronną.

Podobnie negatywny wpływ na otrzymanie spodziewanego sygnału syryngaldazyny miało pokrycie powierzchni elektrod warstwą PVC i OPD. Po pokryciu powierzchni elektrody warstwą PVC zaobserwowano znaczne zmniejszenie sygnału syryngaldazyny. Dodatkowo miała ona negatywny wpływ na rozseparowanie pików. W przypadku warstwy OPD, nie zaobserwowano sygnału, lub był on prawie niewidoczny niezależnie od pH roztworu. Brak sygnału może być związany z korzystniejszym oddziaływaniem fenylenodiaminy z powierzchnią elektrody i desorpcją próbki redoks podczas polimeryzacji.

Jedynie pokrycie warstwą PLLA i PLL-PEG pozwoliło na otrzymanie stabilnego sygnału. Pokrycie elektrod warstwą PLLA spowodowało zwiększenie pojemności elektrod. Na krzywych otrzymano wyraźne piki utleniania i redukcji, które były widoczne również po 3 tygodniach inkubacji w pożywce hodowlanej. W przypadku obu warstw zaobserwowano oczekiwane przesunięcie pików w stronę niższych wartości potencjału wraz ze wzrostem pH roztworu buforowego (~ 50 mV/dec).



Rysunek 3.7. Woltamperogramy cykliczne uzyskane z wykorzystaniem elektrod GCE zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: Nafionem i OPD oraz z wykorzystaniem elektrod grafitowych zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: OPD, PLLA oraz PLL-PEG. Pomiary prowadzono w roztworach buforowych o różnych wartościach pH. Szybkość zmian potencjału: 100 mV/s.

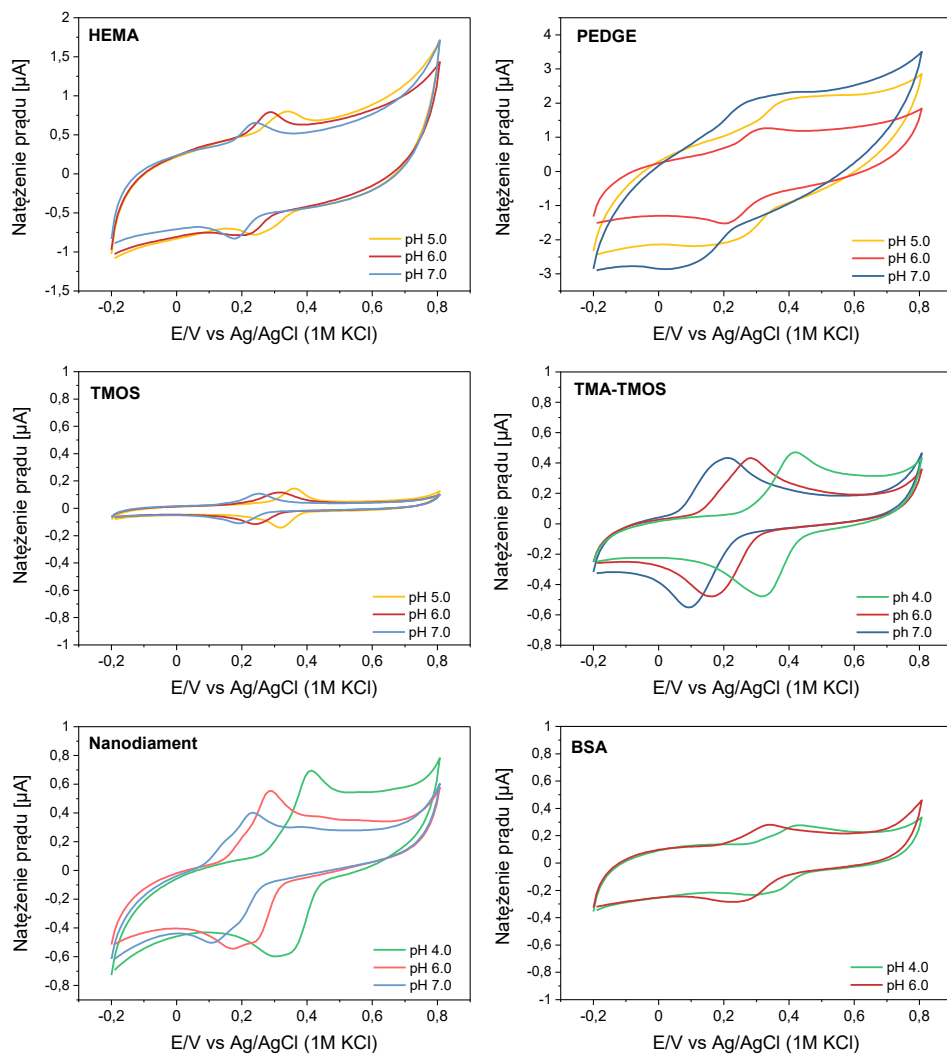
Kolejną badaną grupę związków stanowiły hydrożele. W pracy wykorzystano dwa hydrożele poliHEMA i PEGDE. Podobnie jak w przypadku warstwy PLLA, w obu przypadkach można było zaobserwować zwiększenie pojemności elektrody. W przypadku warstwy poliHEMA na krzywej woltamperometrycznej można zaobserwować wyraźne piki utlenienia i redukcji, w pozycji zależnej od pH. Podczas

wielokrotnych pomiarów w roztworach buforowych nie zaobserwowano pogorszenia sygnału, jednak długoterminowa inkubacja w pożywce komórkowej spowodowała całkowitą utratę sygnału. W drugim tygodniu inkubacji nie zaobserwowano sygnału na woltamperogramie. Z kolei w przypadku hydrożelu PEDGE, sygnał był mniej widoczny, a z każdym kolejnym skanem obserwowano jego powolny spadek. Po pierwszym tygodniu inkubacji sygnał zanikł.

W pracy porównano również dwa różne krzemianowe materiały zol-żel o różnej porowatości, utworzone przez sieciowanie tetrametoksylanu (TMOS) lub tetrametoksylanu z chlorkiem trimetoksylilopropylu-N,N,N trimetyloamoniowym (TMA) – TMOS/TMA. Obie modyfikacje elektrod pozwoliły na obserwację dobrze rozwiniętych pików utleniania/redukcji na krzywej. Inkubacja elektrod pokrytych warstwą TMA/TMOS w pożywce hodowlanej, spowodowała całkowitą utratę sygnału po 24h. W przypadku warstwy TMOS, sygnał wciąż był widoczny na zarejestrowanych krzywych po 3 tygodniach inkubacji w pożywce hodowlanej. Przesunięcie piku zależne od pH wynosiło prawie ~60 mV/dec dla pików redukcji, co jest wartością zbliżoną do teoretycznej.

Jak wspomniano wcześniej właściwości przeciwprowodowe wykazuje również BSA. Zostały wykorzystane dwie metody modyfikacji elektrod. W przypadku bezpośredniego nakroplenia roztworu BSA na elektrodę, nie zaobserwowano sygnału syryngaldazyny na woltamperogramie. Druga metoda, w której BSA zostało zmieszane z PEDGE, pozwoliła na obserwację niewielkiego sygnału syryngaldazyny na uzyskanym woltamperogramie. Uzyskane wyniki w tym przypadku były analogiczne do tych uzyskanych dla hydrożelu poliHEMA, jednak warstwa była mniej stabilna, a jej fragmenty miały tendencję do odrywania się podczas pomiarów.

Ostatnią warstwą ochronną, była warstwa oparta na cząsteczkach nanodiamentu w matrycy TMA/TMOS. Zaobserwowane wyniki były analogiczne do czystej warstwy krzemianowej i nie zaobserwowano żadnego wzmocnienia spowodowanego obecnością nanodiamentu. Na krzywej można zaobserwować wyraźnie zarejestrowane piki utleniania/redukcji, jednak po pierwszych 24h inkubacji sygnał całkowicie zanikł. Wyniki uzyskane na pozostałych warstwach pokazano na Rysunku 3.8.

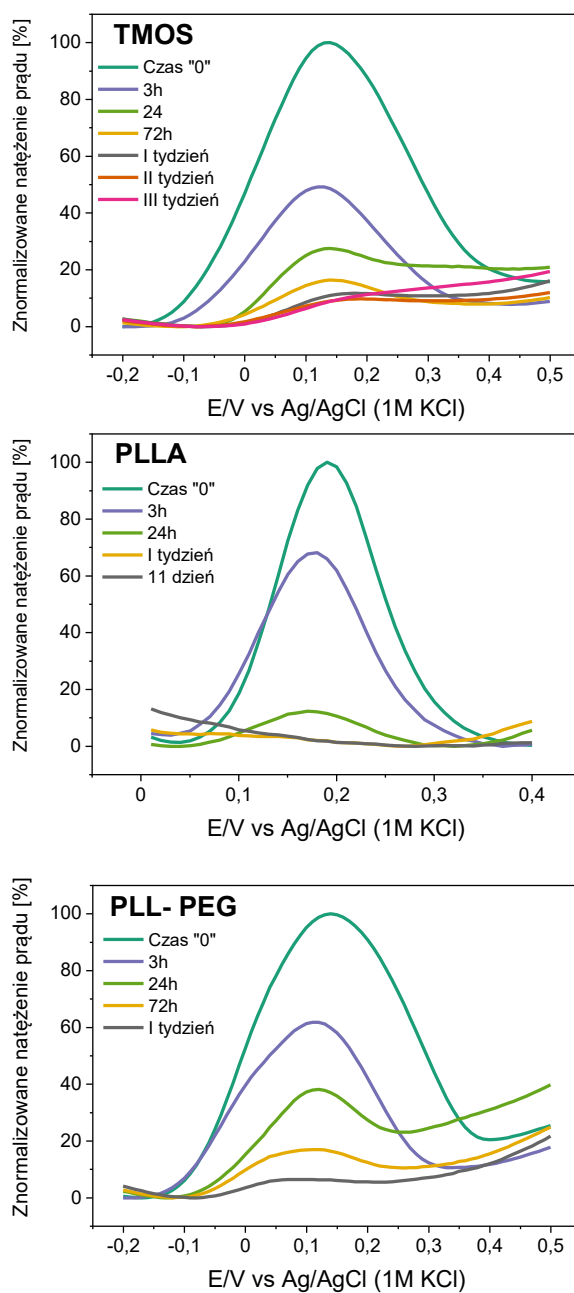


Rysunek 3.8. Woltamperogramy cykliczne uzyskane z wykorzystaniem elektrod grafitowych zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: TMOS, TMA/TMOS, PEDGE, poliHEMA oraz z wykorzystaniem elektrod GCE zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: BSA oraz ND. Pomiarzy prowadzono w roztworach buforowych o różnych wartościach pH. Szybkość zmian potencjału: 100 mV/s.

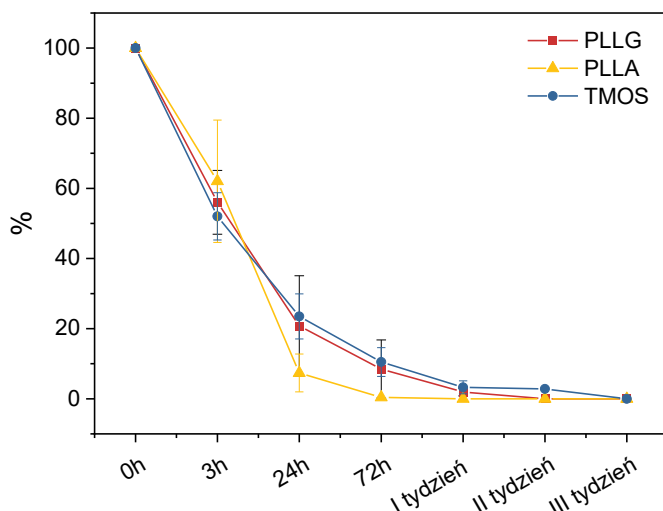
3.4.3. Ocena wpływu środowiska hodowli komórkowej na stabilność warstw przeciwpoporostowych

W poprzednim kroku zidentyfikowano warstwy przeciwpoporostowe, które mogłyby posłużyć jako warstwa ochronna w długoterminowych pomiarach przeprowadzonych w hodowli komórkowej. Kolejnym etapem badań była ocena wpływu środowiska hodowli komórkowej na ich stabilność. Elektrody grafitowe modyfikowane syryngaldazyną, zostały pokryte odpowiednią warstwą ochronną: PLLA, TMOS i PLL-PEG. Następnie elektrody zostały przymocowane do ściany płytki do hodowli tkankowej, tak aby nie dotykały dna płytki hodowlanej (Rysunek 3.1.). Na płytkę wysiano komórki linii HeLa o gęstości 10^6 komórek /ml, a elektrody pozostały zanurzone w pożywce hodowlanej przez cały czas trwania eksperymentów (warunki pomiaru: 5% CO₂, 37°C). Komórki linii HeLa zostały wykorzystane jako modelowa linia komórkowa ze względu na ich wysoki wskaźnik proliferacji^[62]. Ocena stabilności warstw ochronnych została oparta na pomiarach DPV i wysokości otrzymanych pików. Pomiary były prowadzone w trakcie inkubacji tj. po 3h, po 24h, po 72h, po 1 tygodniu, po 2 tygodniach oraz po 3 tygodniach. Jako 100% wysokości pików DPV, wzięto sygnał z początku eksperymentów, czyli tuż po wysianiu komórek linii HeLa na płytkę i dodaniu pożywki hodowlanej.

Na podstawie przeprowadzonych badań zauważono bezpośredni wpływ środowiska hodowli komórkowej na zastosowaną warstwę przeciwpoporostową. Jednak wszystkie trzy materiały spełniły swoją funkcję i wpłynęły w pewnym stopniu pozytywnie na spontaniczną absorpcję cząsteczek biologicznych obecnych w pożywce hodowlanej. Otrzymane wyniki pokazują, że sygnał pochodzący od syryngaldazyny zmniejsza się wraz z długością inkubacji w hodowli (Rysunek 3.9. – 3.10.). Zauważono, że największa zmiana sygnału jest obserwowana podczas pierwszych trzech godzin inkubacji. Powierzchnia otrzymanego sygnału pochodzącego od syryngaldazyny zmniejszyła się tylko o jedną czwartą w przypadku modyfikacji PLLA, o połowę w przypadku dwóch pozostałych modyfikacji. Badania wykazały, że sygnał pochodzący od syryngaldazyny jest najdłużej obserwowany dla modyfikacji TMOS, i w tym wypadku może być rejestrowany aż do 6 tygodni. Natomiast w przypadku modyfikacji PLL-PEG, sygnał jest wyraźny tylko do 2 tygodni, a dla modyfikacji PLLA całkowitą utratę sygnału zaobserwowano już po 72 godzinach.



Rysunek 3.9. Krzywe uzyskane metodą DPV dla elektrod grafitowych modyfikowanych syryngaldazyną i pokrytych warstwą ochronną PLLA, TMOS i PLL-PEG podczas 3-tygodniowej inkubacji elektrod w środowisku hodowli komórkowej komórek linii HeLa w układzie przedstawionym na Rysunku 3.1.

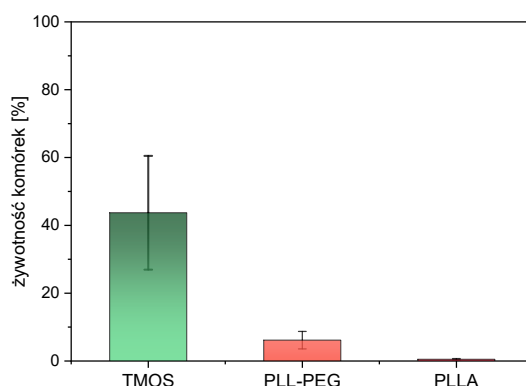


Rysunek 3.10. Spadek sygnału syringaldazyny w trakcie 3-tygodniowej inkubacji w hodowli komórkowej komórek linii HeLa. Odchylenie standardowe obliczone dla N=6.

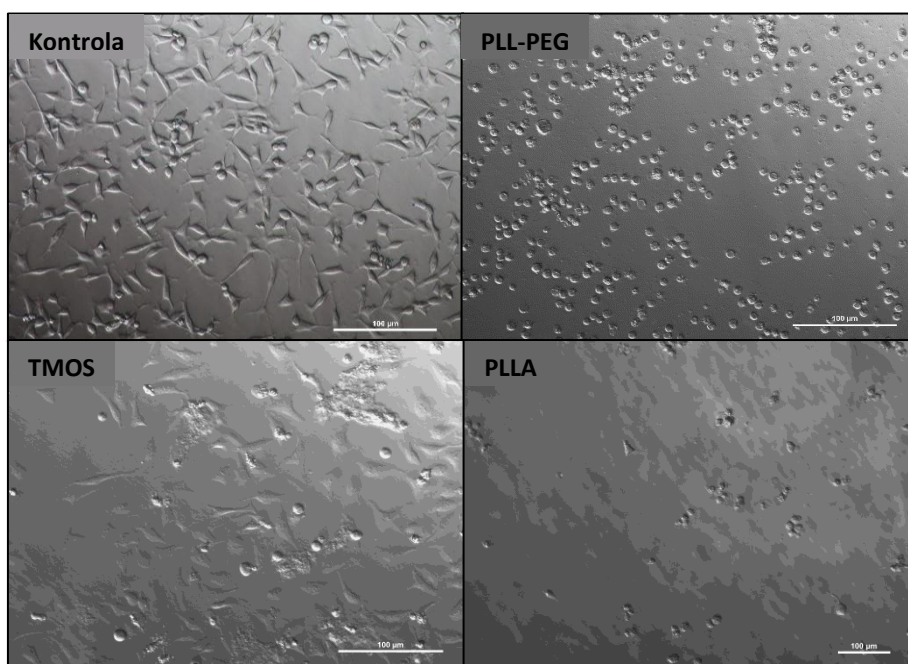
W celu określenia cytotoksyczności związków wykorzystywanych w powyższych warstwach przeciwpoporostowych przeprowadzono dodatkowo test z wykorzystaniem barwnika AlamarBlue. Analizę cytotoksyczności przeprowadzono po 24h od wysiania komórek na warstwy przeciwpoporostowe pokrywające dołki na płytce 96-dołkowej ze szklanym dnem.

Wyniki testu AlamarBlue przedstawione na Rysunku 3.11. niejednoznacznie pokazują wpływ wykorzystywanych związków na żywotność komórek. Uzyskane wyniki wskazują na niską żywotność komórek rosnących na warstwie PLLA i PLL-PEG. Jednak na zdjęciach wyraźnie widać, że komórki linii HeLa w przypadku warstwy PLL-PEG nie były prawidłowo przyczepione do podłoża. Część z nich mogła nie przykleić się prawidłowo do podłoża i zostać wymyta podczas zmiany pożywki przed wykonaniem testu. Podobnie w przypadku warstwy PLLA, nieprzyklejone komórki zostały wymyte, dlatego otrzymano niską żywotność. W przypadku warstwy TMOS, uzyskano dużo wyższą żywotność (50% w stosunku do kontroli), jednak na zdjęciach można zaobserwować, że również w tym przypadku część komórek nie przykleiła się prawidłowo. Obniżona żywotność komórek może być potwierdzeniem właściwości przeciwpoporostowych przebadanych warstw. Przeprowadzone pomiary elektrochemiczne wskazują na znaczące obniżenie sygnału w miarę upływu czasu kontaktu z pożywką hodowlaną, dlatego brak prawidłowej adhezji komórek oraz ich wymycie może wskazywać na właściwości przeciwpoporostowe. Należałoby jednak rozszerzyć badanie biokompatybilności na przykład poprzez wydłużenie suszenia płytki po pokryciu wybranymi materiałami lub

dodatkową analizę śladową roztworu po przepłukaniu dołka szczególnie ze względu na rozpuszczalniki organiczne użyte do pokrycia warstw elektrod. Zdjęcia komórek przedstawiono na Rysunku 3.12.



Rysunek 3.11. Ocena żywotności komórek linii HeLa po 24h hodowli na warstwach przeciwporystych na płytce 96-dółkowej dla warstwy TMOS, PLL-PEG oraz PLLA, w stosunku do komórek rosnących na dołku niepokrytym warstwą przeciwporystą. Odchylenie standardowe obliczone dla N=6.



Rysunek 3.12. Zestawienie zdjęć z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ warstw przeciwporystych na żywotność komórek linii HepG2 po 24h hodowli komórek z wykorzystaniem płytki 96-dółkowej. Skala 100 µm.

3.5. Wnioski

Przeprowadzone badania potwierdzają, że długoterminowe pomiary w bardziej złożonych próbkach biologicznych takich jak pożywka hodowlana znacząco wpływają na odpowiedź wykorzystywanego czujnika. Pozwoliły one na zidentyfikowanie warstwy przeciwporostowej, która mogłaby posłużyć jako warstwa ochronna na elektrodach węglowych w długoterminowych pomiarach w hodowli komórkowej. Do oceny warstw został wybrany próbnik redoks, syryngaldazyna, którą została pokryta powierzchnia elektrody w pierwszym etapie modyfikacji. Pozwoliło to na przetestowanie nie tylko efektu ochronnego modyfikacji przeciwporostowej, ale także jej wpływ na elektroaktywną modyfikację elektrody. Jest to cecha często pomijana w tego typu badaniach. Powszechnie stosowane warstwy, takie jak Nafion, polifenylenodiamina i PVC, miały negatywny wpływ na syryngaldazynę, co uniemożliwiło ocenę wpływu pożywki hodowlanej na stabilność tych warstw.

Modyfikacja TMOS została zidentyfikowana jako najbardziej skuteczny materiał przeciwporostowy w hodowli komórkowej, ponieważ sygnał z warstwy wskaźnikowej był widoczny przez cały czas trwania eksperymentu, a test cytotoksyczności nie wykazał wyraźnych efektów toksycznych dla linii komórkowej HeLa. Eksperymenty przeprowadzone przy użyciu PLLA i PLL-PEG pokazują, że obie warstwy mogą być również stosowane jako powłoka przeciwporostowa, szczególnie w krótszych pomiarach, w których spontaniczna absorpcja zniekształca wyniki. Wyniki wskazują, że pierwsze godziny kontaktu warstw przeciwporostowych z pożywką hodowlaną najbardziej wpływają na rejestrowany sygnał. W ciągu pierwszych trzech godzin powierzchnia piku zmniejszyła się dla warstwy PLLA o jedną czwartą, a dla modyfikacji TMOS o połowę.

Obecne w literaturze badania nad warstwami przeciwporostowymi pokazują szeroki zakres zastosowań czujników w złożonych próbkach biologicznych takich jak próbki krwi, surowicy, czy osocza, jednak badania te nie skupiają się nad długoterminową stabilnością warstw, a nad obniżeniem granicy detekcji lub umożliwieniem bezpośredniej analizy np. biomarkerów we krwi. Podawana stabilność bioczuownika jest sprawdzana poprzez krótkie pomiary oznaczania substancji, pomiędzy którymi czujnik jest przechowywany w warunkach obniżonej temperatury, a więc nie jest narażony na bezpośrednie działanie środowiska próbki^[5]. Takie badania są często podejmowane w kontekście badań *in vivo* gdzie istnieje potrzeba długoterminowych badań w czasie rzeczywistym^[4].

Warto również zauważyć, że w przeciwieństwie do czujników, które są oparte na selektywności receptora biologicznego np. enzymów, antygenów lub aptamerów,

czujniki pozwalające na detekcję bezznacznikową, są znacznie bardziej podatne na niespecyficzną adsorpcję na powierzchni czujników^[4].

3.6. Literatura

1. Hanssen BL, Siraj S, Wong DKY. Recent strategies to minimise fouling in electrochemical detection systems. *Rev Anal Chem.* 2016;35(1):1-28.
2. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017;16(2):99-117.
3. Wongkaew N, Simsek M, Griesche C, Baeumner AJ. Functional Nanomaterials and Nanostructures Enhancing Electrochemical Biosensors and Lab-on-a-Chip Performances: Recent Progress, Applications, and Future Perspective. *Chem Rev.* 2019;119(1):120-194.
4. Jiang C, Wang G, Hein R, Liu N, Luo X, Davis JJ. Antifouling Strategies for Selective *In Vitro* and *In Vivo* Sensing. *Chem Rev.* 2020;120(8):3852-3889.
5. Song Z, Han R, Yu K, Li R, Luo X. Antifouling strategies for electrochemical sensing in complex biological media. *Microchim Acta.* 2024;191(3):138.
6. Lakshmipathiraj P, Bhaskar Raju G, Sakai Y, et al. Studies on electrochemical detoxification of trichloroethene (TCE) on Ti/IrO₂-Ta₂O₅ electrode from aqueous solution. *Chem Eng J.* 2012;198-199:211-218.
7. Stoytcheva M, Zlatev R, Gochev V, Velkova Z, Montero G, Beleño MT. Amperometric biosensors precision improvement. Application to phenolic pollutants determination. *Electrochimica Acta.* 2014;147:25-30.
8. Zhou L, Li X, Zhu B, Su B. An Overview of Antifouling Strategies for Electrochemical Analysis. *Electroanalysis.* 2022;34(6):966-975.
9. Saxena S, Sen P, Soleymani L, Hoare T. Anti-Fouling Polymer or Peptide-Modified Electrochemical Biosensors for Improved Biosensing in Complex Media. *Adv Sens Res.* 2024;3(5):2300170.
10. Lin PH, Li BR. Antifouling strategies in advanced electrochemical sensors and biosensors. *The Analyst.* 2020;145(4):1110-1120.
11. Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM. A Survey of Structure-Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein. *Langmuir.* 2001;17(18):5605-5620.
12. Campuzano S, Pedrero M, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Antifouling (Bio)materials for Electrochemical (Bio)sensing. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):423.
13. Capuana E, Lopresti F, Ceraulo M, La Carrubba V. Poly-L-Lactic Acid (PLLA)-Based Biomaterials for Regenerative Medicine: A Review on Processing and Applications. *Polymers.* 2022;14(6):1153.
14. Pan J, Xie Q, Chiang H, et al. "From the Nature for the Nature": An Eco-Friendly Antifouling Coating Consisting of Poly(lactic acid)-Based Polyurethane and Natural Antifoulant. *ACS Sustain Chem Eng.* 2020;8(3):1671-1678.
15. Hendrick E, Frey M. Increasing Surface Hydrophilicity in Poly(Lactic Acid) Electrospun Fibers by Addition of Pla-b-Peg Co-Polymers. *J Eng Fibers Fabr.* 2014;9(2).

16. Park SA, Lee SJ, Seok JM, Lee JH, Kim WD, Kwon IK. Fabrication of 3D Printed PCL/PEG Polyblend Scaffold Using Rapid Prototyping System for Bone Tissue Engineering Application. *J Bionic Eng.* 2018;15(3):435-442.
17. Kivlehan F, Garay F, Guo J, Chaum E, Lindner E. Toward Feedback-Controlled Anesthesia: Voltammetric Measurement of Propofol (2,6-Diisopropylphenol) in Serum-Like Electrolyte Solutions. *Anal Chem.* 2012;84(18):7670-7676.
18. Wisniewski N, Reichert M. Methods for reducing biosensor membrane biofouling. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2000;18(3-4):197-219.
19. Brightman E, Pasquier D. Measurement and adjustment of proton activity in solid polymer electrolytes. *Electrochem Commun.* 2017;82:145-149.
20. Patel BA, Arundell M, Parker KH, Yeoman MS, O'Hare D. Detection of Nitric Oxide Release from Single Neurons in the Pond Snail, *Lymnaea stagnalis*. *Anal Chem.* 2006;78(22):7643-7648.
21. Özel RE, Ispas C, Ganesana M, Leiter JC, Andreescu S. Glutamate oxidase biosensor based on mixed ceria and titania nanoparticles for the detection of glutamate in hypoxic environments. *Biosens Bioelectron.* 2014;52:397-402.
22. Peng J, Su Y, Chen W, et al. Antifouling Membranes Prepared by a Solvent-Free Approach via Bulk Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate. *Ind Eng Chem Res.* 2013;52(36):13137-13145.
23. Russo MJ, Han M, Desroches PE, et al. Antifouling Strategies for Electrochemical Biosensing: Mechanisms and Performance toward Point of Care Based Diagnostic Applications. *ACS Sens.* 2021;6(4):1482-1507.
24. Kim J, Delio R, Dordick JS. Protease-Containing Silicates as Active Antifouling Materials. *Biotechnol Prog.* 2002;18(3):551-555.
25. Scampicchio M, Arecchi A, Lawrence NS, Mannino S. Nylon nanofibrous membrane for mediated glucose biosensing. *Sens Actuators B Chem.* 2010;145(1):394-397.
26. Marler B, Gies H. Crystal structure analyses of two TMA silicates with ordered defects: RUB-20, a layered zeolite precursor, and RUB-22, a microporous framework silicate. *Z Für Krist - Cryst Mater.* 2015;230(4):243-262.
27. Ma GJ, Ferhan AR, Jackman JA, Cho NJ. Conformational flexibility of fatty acid-free bovine serum albumin proteins enables superior antifouling coatings. *Commun Mater.* 2020;1(1):45.
28. Chen Q, Zhang D, Gu J, et al. The impact of antifouling layers in fabricating bioactive surfaces. *Acta Biomater.* 2021;126:45-62.
29. Geng F, Li Y, Wu Q, Ding C. An efficient electrochemical biosensor based on double-conductive hydrogel as antifouling interface for ultrasensitive analysis of biomarkers in complex serum medium. *Sens Actuators B Chem.* 2025;422:136625.
30. Lee MH, Brass DA, Morris R, Composto RJ, Ducheyne P. The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. *Biomaterials.* 2005;26(14):1721-1730.
31. Jachimska B, Pajor A. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry.* 2012;87:138-146.

32. Tworek P, Rakowski K, Szota M, Lekka M, Jachimska B. Changes in Secondary Structure and Properties of Bovine Serum Albumin as a Result of Interactions with Gold Surface. *ChemPhysChem*. 2024;25(2):e202300505.
33. Kaewket K, Karuwan C, Sonsupap S, Maensiri S, Ngamchuea K. Anti-Fouling Effects of Carbon Nanofiber in Electrochemical Sensing of Phenolic Compounds. *J Electrochem Soc*. 2021;168(6):067501.
34. Weese ME, Krevh RA, Li Y, Alvarez NT, Ross AE. Defect Sites Modulate Fouling Resistance on Carbon-Nanotube Fiber Electrodes. *ACS Sens*. 2019;4(4):1001-1007.
35. Araújo DAG, Pradela-Filho LA, Marra MC, et al. Enhancing fouling resistance of graphite sheets for electrochemical sensing of bisphenol-A. *The Analyst*. 2025;150(12):2632-2642.
36. Shan C, Yang H, Song J, Han D, Ivaska A, Niu L. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. *Anal Chem*. 2009;81(6):2378-2382.
37. McCreery RL. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem Rev*. 2008;108(7):2646-2687.
38. Puthongkham P, Venton BJ. Nanodiamond Coating Improves the Sensitivity and Antifouling Properties of Carbon Fiber Microelectrodes. *ACS Sens*. 2019;4(9):2403-2411.
39. Rifai A, Tran N, Reineck P, et al. Engineering the Interface: Nanodiamond Coating on 3D-Printed Titanium Promotes Mammalian Cell Growth and Inhibits *Staphylococcus aureus* Colonization. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(27):24588-24597.
40. Cloutier M, Mantovani D, Rosei F. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. *Trends Biotechnol*. 2015;33(11):637-652.
41. Francolini I, Vuotto C, Piozzi A, Donelli G. Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. *APMIS*. 2017;125(4):392-417.
42. Lin HF, Liao SC, Hung SW. The dc thermal plasma synthesis of ZnO nanoparticles for visible-light photocatalyst. *J Photochem Photobiol Chem*. 2005;174(1):82-87.
43. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(6):371-384.
44. Trouillon R, Combs Z, Patel BA, O'Hare D. Comparative study of the effect of various electrode membranes on biofouling and electrochemical measurements. *Electrochem Commun*. 2009;11(7):1409-1413.
45. Patel J, Radhakrishnan L, Zhao B, et al. Electrochemical Properties of Nanostructured Porous Gold Electrodes in Biofouling Solutions. *Anal Chem*. 2013;85(23):11610-11618.
46. Hu Y, Liang B, Fang L, et al. Antifouling Zwitterionic Coating via Electrochemically Mediated Atom Transfer Radical Polymerization on Enzyme-Based Glucose Sensors for Long-Time Stability in 37 °C Serum. *Langmuir*. 2016;32(45):11763-11770.
47. Michalak M, Kurel M, Jedraszko J, et al. Voltammetric pH Nanosensor. *Anal Chem*. 2015;87(23):11641-11645.

48. Singh YS, Sawarynski LE, Dabiri PD, Choi WR, Andrews AM. Head-to-Head Comparisons of Carbon Fiber Microelectrode Coatings for Sensitive and Selective Neurotransmitter Detection by Voltammetry. *Anal Chem.* 2011;83(17):6658-6666.
49. Razmi H, Heidari H. Nafion/lead nitroprusside nanoparticles modified carbon ceramic electrode as a novel amperometric sensor for l-cysteine. *Anal Biochem.* 2009;388(1):15-22.
50. Killoran SJ, O'Neill RD. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochimica Acta.* 2008;53(24):7303-7312.
51. Nery EW, Kubota LT. Integrated, paper-based potentiometric electronic tongue for the analysis of beer and wine. *Anal Chim Acta.* 2016;918:60-68.
52. Koschwanetz HE, Yap FY, Klitzman B, Reichert WM. *In vitro* and *in vivo* characterization of porous poly- L -lactic acid coatings for subcutaneously implanted glucose sensors. *J Biomed Mater Res A.* 2008;87A(3):792-807.
53. Vasylieva N, Maucler C, Meiller A, et al. Immobilization Method to Preserve Enzyme Specificity in Biosensors: Consequences for Brain Glutamate Detection. *Anal Chem.* 2013;85(4):2507-2515.
54. Yu B, Wang C, Ju YM, et al. Use of hydrogel coating to improve the performance of implanted glucose sensors. *Biosens Bioelectron.* 2008;23(8):1278-1284.
55. Rozniecka E, Jonsson-Niedziolka M, Celebanska A, Niedziolka-Jonsson J, Opallo M. Selective electrochemical detection of dopamine in a microfluidic channel on carbon nanoparticulate electrodes. *The Analyst.* 2014;139(11):2896.
56. Kenausis GL, Vörös J, Elbert DL, et al. Poly(L -lysine)- g -Poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Attachment Mechanism and Effects of Polymer Architecture on Resistance to Protein Adsorption. *J Phys Chem B.* 2000;104(14):3298-
57. Shao Z, Wilson L, Chang Y, Venton BJ. MPCVD-Grown Nanodiamond Microelectrodes with Oxygen Plasma Activation for Neurochemical Applications. *ACS Sens.* 2022;7(10):3192-3200.
58. Kieninger J, Weltin A, Flamm H, Urban GA. Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip. *Lab Chip.* 2018;18(9):1274-1291.
59. Hammon, K. Screen-Printed Electrode Information. Published online 2016. <https://pinerresearch.com/shop/wp-content/uploads/sites/2/2016/10/DRP10036-Screen-Printed-Electrodes-Overview-REV004.pdf>.
60. David IG, Popa DE, Buleandra M. Pencil Graphite Electrodes: A Versatile Tool in Electroanalysis. *J Anal Methods Chem.* 2017;2017:1-22.
61. Gu X, Albrecht W, Edlund K, et al. Relevance of the incubation period in cytotoxicity testing with primary human hepatocytes. *Arch Toxicol.* 2018;92(12):3505-3515.
62. Tang L. Investigating heterogeneity in HeLa cells. *Nat Methods.* 2019;16(4):281-281.

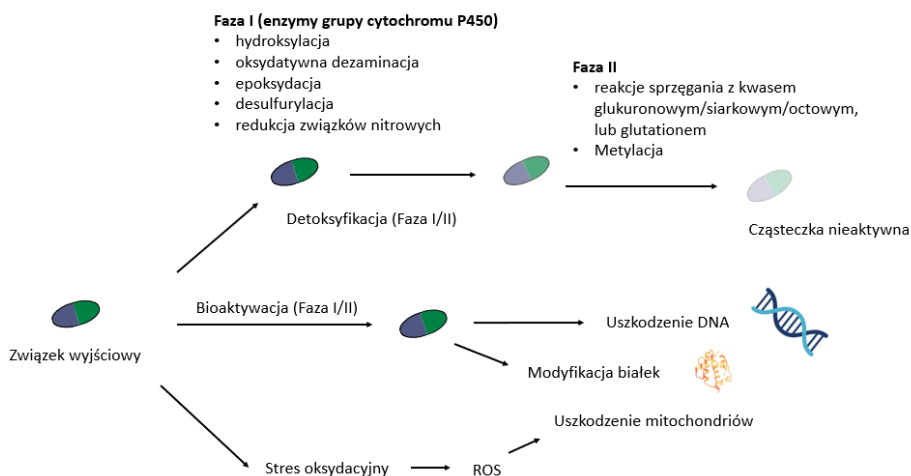
4. Ocena możliwości wykorzystania opracowanej macierzy elektrodowej do monitorowania hodowli komórkowych

4.1. Wprowadzenie

Wątroba jest głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm ksenobiotyków i odgrywa kluczową rolę w farmakokinetyce klinicznej. Ocena parametrów fizjologicznych wątroby ma kluczowe znaczenie w opracowaniu nowych leków^[1]. Wątroba przede wszystkim składa się z komórek wątrobowych – hepatocytów, które stanowią około 70-80% masy wątroby, z komórek gwiaździstych, komórek Kupffera, komórek NK (ang. *natural killer cells*) oraz fibroblastów^[2].

Głównym celem przemiany ksenobiotyków, substancji obcych, nienaturalnych dla organizmu człowieka jest zwiększenie ich polarności, co ułatwia ich wydalanie. W pierwszej fazie zachodzą reakcje hydroksylacji katalizowane m.in. przez enzymy zaliczane do grupy cytochromu P450 oraz reakcje hydrolizy. Druga faza polega na kolejnym przekształceniu poprzez metylację lub sprzęganie z kwasem glutaronowym, siarczanami lub glutationem^[3].

Ksenobiotyki w wyniku przekształcenia w pierwszej fazie mogą ulec zarówno aktywacji, lub dezaktywacji. Aktywacja związków chemicznych może spowodować uszkodzenie komórek poprzez następcze wiązanie z białkami czy cząsteczką DNA/RNA, dlatego w procesie badań przedklinicznych bardzo ważnym etapem są badania *in vitro*, szczególnie przeprowadzone na komórkach wątrobowych (Rysunek 4.1.).



Rysunek 4.1. Schematyczne przedstawienie rozkładu ksenobiotyków w organizmie. Rysunek wykonano na podstawie: ^[3,4].

Tak zwanym złotym standardem w toksykologii są badania przeprowadzane na zwierzętach oraz badania *in vitro* komórkach pierwotnych^[5]. Badania z udziałem modeli zwierzęcych pozwalają ocenić łączny wpływ wszystkich parametrów farmakokinetycznych i efektów farmakologicznych badanych substancji. Z kolei komórki pierwotne mają istotny wpływ na fizjologicznie istotną ekspresję kofaktorów, enzymów i błonowych transporterów leków^[6]. Istotnym czynnikiem ograniczającym wykorzystanie komórek pierwotnych jest utrata aktywności metabolicznej w ciągu kilku godzin lub dni po wysianiu na hodowli 2D^[7], a także różnice między osobnikami i zmiany komórkowe spowodowane procedurą izolacji powodujące różnice w wynikach eksperymentów^[8].

Ze względu na możliwość nieograniczonej proliferacji, ustalone linie komórkowe takie jak HepG2, HepaRG oraz Huh7 są również wykorzystywane w badaniach toksykologicznych. Linia HepG2 charakteryzuje się wysoką ekspresją genów biorących udział w przemianie ksenobiotyków fazy II^[9], jednak bardzo niska ekspresja enzymów metabolizujących leki w fazie I (oprócz CYP2B6) ogranicza jej wykorzystanie. Komórki linii HepG2 są często modyfikowane genetycznie w celu stabilnej ekspresji enzymów z grupy CYP. Dodatkowo komórki tej linii zachowały swoje pierwotne cechy jak zdolność do syntezy albuminy i magazynowania glikogenu^[10,11]. Komórki linii Huh7 wykazują ekspresję genów metabolizujących leki ksenobiotyczne fazy I i II, a także genów niektórych kluczowych transkryptów specyficznych dla hepatocytów^[12]. Linia komórkowa HepaRG to linia pochodząca z guza wątroby, która wykazuje podobieństwo do hepatocytów. Komórki posiadają stabilny fenotyp i zdolność ekspresji enzymów metabolizujących leki w obu fazach. Pomimo tego wykorzystanie komórek linii HepaRG często nie jest wystarczające w ocenie toksykologicznej, ze względu na ekspresję enzymów fazy I, które odpowiadają tylko za 30% metabolizowanych leków dostępnych na rynku^[8,13].

Możliwość różnicowania się indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych (iPSCs) w hepatocyty daje im istotną przewagę nad innymi rodzajami badań *in vitro*. Obecnie generowane komórki iPSC nie wykazują funkcji dorosłych komórek wątroby, natomiast wykazują zdolność do syntezy albuminy, magazynowania glikogenu i ekspresji CYP, dlatego przypominają bardziej dorosłe pierwotne hepatocyty niż różne linie komórkowe raka wątroby^[4].

Metody oceny toksykologicznej proponowanych substancji leczniczych opierają się na punktach końcowych cytotoksyczności jak zachowanie integralności błon komórkowych, zawartość metabolitów komórkowych lub zachowane funkcje mitochondriów i lizosomów^[14]. Zastosowanie szerokiego zakresu stężeń badanego związku pozwala na określenie krzywej dawka-odpowiedź oraz wyznaczenie m.in. współczynnika IC₅₀ określającego połowę minimalnego stężenia do zahamowania

aktywności biologicznej. Ważnym jest szczególnie monitorowanie biomarkerów metabolizmu ze względu na możliwość wczesnych zmian w specyficznych składnikach strukturalnych, biochemicznych czy metabolicznych. Mogą prowadzić one do zmian w funkcjonalności komórek nie powodując ich śmierci^[15]. Najbardziej reprezentatywna wydaje się być ocena aktywności mitochondriów, lizosomów, zawartości ATP w komórkach, wskaźnika poboru tlenu przez komórki^[16] czy aktywności kaspaz-3^[14].

Pomiary stężenia tlenu w hodowli komórkowej mogą dostarczyć informacji dotyczącej utraty funkcji mitochondriów, ze względu na udział tlenu w procesie fosforylacji oksydacyjnej^[17]. Jednak w hodowlach *in vitro* monitorowanie zużycia tlenu przez komórki wydaje się być dość trudnym zadaniem nie tylko ze względu na obecny tlen w powietrzu atmosferycznym, ale również na odzwierciedlenie samych warunków *in vivo*. Natlenienie poszczególnych organów różni się między sobą, a dodatkowo jest ono znacznie niższe niż poziom tlenu w inkubatorze do hodowli komórkowej^[18]. Istotną kwestią jest również umiejscowienie czujników. Wykorzystanie układów mikroprzepływowych umożliwia pomiar różnicy pomiędzy kanałem wejściowym, a wyjściowym^[19], a więc rzeczywiste wykorzystanie tlenu dostarczanego z pożywką hodowlaną oraz tworzenie gradientu dostarczanych gazów (w tym tlenu) do komórek. Z drugiej strony wydaje się ważne, aby czujniki tlenu znajdowały się jak najbliżej komórek jednocześnie powodując jak najmniejszą ingerencję w ich wzrost^[20]. W hodowlach 3D czujniki powinny znajdować się w całej objętości hodowli, aby umożliwić jak najdokładniejsze odwzorowanie stężenia tlenu na różnej wysokości hodowli. Istotną kwestią jest również wybór materiału samego układu. Ze względu na przepuszczalność gazów, w tym dyfuzji tlenu, do hodowli najczęściej wykorzystywane są elementy wykonane z PDMS^[21]. Z kolei brak przepuszczalności tlenu jest ważny w przypadku hodowli, w których wymagana jest precyzyjna kontrola poziomu tlenu. Elementy silikonowe, szklane lub oparte na kleju epoksydowym tiolowo-enowym, zwanym ostemerem nie przepuszczają tlenu^[22].

Badania zaprezentowane w niniejszym rozdziale zostały wykonane we współpracy z mgr. inż. Weroniką Góral (bioczujniki glukozy). Wraz z prof. Martinem Jönsson-Niedziółką wykonałam procedurę napyłania złotych elektrod. Część przedstawionych badań była zrealizowana w ramach stażu na Uniwersytecie Leibniza w Hanowerze.

4.2. Materiały i metody

4.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

- Inkubator do hodowli linii komórkowych z podłączeniem CO₂ (Biogenet),
- Inkubatorze do hodowli linii komórkowych C16 (Labotect Labor Technik-Göttingen GmbH),
- Komora laminarna (ThermoFisher),
- Mikroskop fluorescencyjny (Zeiss),
- Czytnik płytek wielodołkowych Fluoroskan Acent (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA),
- Czytnik płytek wielodołkowych Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments),
- Urządzenie do obrazowania komórek - Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius),
- Hemacytometr (Countess II Cell Counter),
- Waga analityczna (Mettler Toledo),
- Wirówko-worteks (Combi-Spin),
- Napyłarka (Leica EM MED020),
- Grawerka laserowa CO₂ (GCC),
- Optoda tlenowa (PyroScience).

4.2.2. Materiały

- Komercyjne elektrody złote (Mineral),
- Płytki ITO (Delta Technologies),
- Podłoże Borofloat® 33 (SCHOTT),
- Folia transparentna (Xerox),
- Target do napyłania złota (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Target do napyłania chromu (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Target do napyłania tytanu (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Probówki typu eppendorf (Bionovo),
- Końcówki do pipet (Gilson),
- Probówki typu Falcon 15 ml (Sarstedt),
- Probówki typu Falcon 50 ml (Sarstedt),
- Pipety serologiczne (Sarstedt),
- Płytki do liczenia komórek (ThermoFisherScientific),
- Butelki do hodowli komórkowej (Sarstedt),

- Płytki 96-dołkowe oraz 48- dołkowe (Greiner Bio-One, CELLSTARR).

4.2.3. Odczynniki

Acetaminofenon (Sigma-Aldrich), aldehyd glutarowy (Sigma-Aldrich), metylosulfotlenek (DMSO) (Sigma-Aldrich), glukoza (ChemPur), oksydaza glukozy (Sigma-Aldrich), tabletki PBS (ROTH).

Wykorzystane odczynniki charakteryzowały się czystością analityczną i były przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta. Do sporządzania wodnych roztworów wzorcowych oraz buforowych wykorzystywano wodę demineralizowaną z systemu Sartorius Arium Comfort I, o rezystancji równej 18.2 MΩ·cm.

4.3. Metody badań

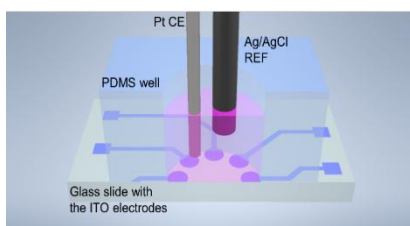
4.3.1. Pomiary elektrochemiczne

Pomiary elektrochemiczne przeprowadzono za pomocą potencjostatu oraz PalmSens 4 kontrolowanego przez oprogramowanie PSTrace (wersja 5.8 oraz 5.9). Pomiary wykonano w układzie trójelektrodowym składającym się z wybranej elektrody pracującej, elektrody odniesienia Ag/AgCl (1 M KCl) o średnicy 2 mm (IJ Cambria Scientific Ltd.) oraz drutu platynowego o średnicy 0,5 mm (Mennica Metale Sp. z o.o.) jako elektrody pomocniczej.

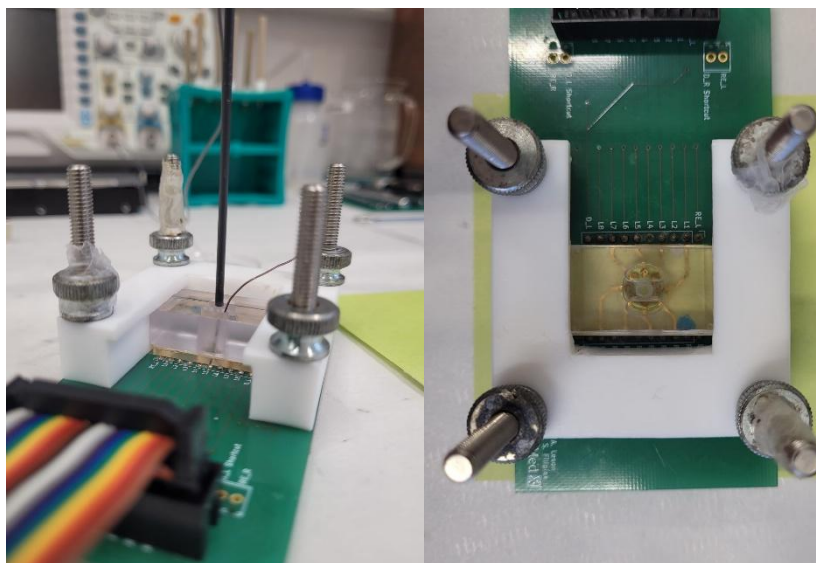
4.3.2. Układ pomiarowy

W ramach projektu LIDER pt. „Trójwymiarowe podłoża ze zintegrowanym multielektrodowym układem pomiarowym do zastosowań w hodowlach komórkowych i farmacji” dr Karthika Kappalakandy Valapil opracowała niskokosztowe elektrody ITO do pomiarów elektrochemicznej impedancji spektroskopowej (EIS) w celu monitorowania adhezji komórek na elektrodach. Z tego względu postanowiono połączyć w ramach jednej macierzy elektrody ITO oraz elektrody złote w celu monitorowania zawartości tlenu w pożywce hodowlanej (Rozdział 2.4.2.1), a co za tym idzie wykorzystać układ pomiarowy, który został uprzednio opracowany w ramach pracy magisterskiej Amy Leson, pt. *„Design and assessment of a microfluidic nanomaterial-based biosensing platform”*^[23]. Ostatecznie w niniejszym rozdziale wykorzystano tylko elektrody złote na których przeprowadzono pomiar EIS, detekcji tlenu oraz pomiar stężenia glukozy.

Geometria układu opiera się na okrągłej komorze hodowlanej o średnicy 10 mm i wysokości 6 mm. Układ pomiarowy został wykorzystany do hodowli hepatocytów (komórki HepG2) oraz komórek HeLa^[24] w pomiarach adhezji komórek do podłoża. Przekrój układu pomiarowego przedstawiono na Rysunku 4.2. a zdjęcie układu na Rysunku 4.3.



Rysunek 4.2. Przekrój układu pomiarowego do statycznych hodowli komórkowych.



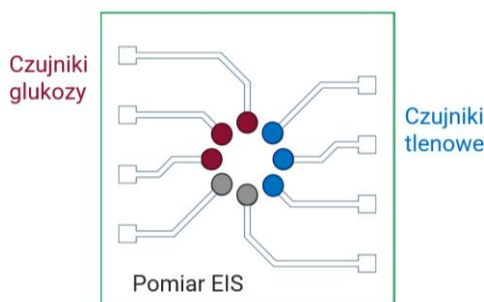
Rysunek 4.3. Zdjęcie układu pomiarowego do statycznych hodowli komórkowych.

4.3.3. Przygotowanie elektrod

Do badań przedstawionych w niniejszym rozdziale wykorzystano komercyjne elektrody złote (o średnicy 3 mm) oraz macierz 8-elektrodową, na której były wytworzone elektrody złote o nominalnej średnicy 1,75 mm za pomocą procesu

napiłania w wysokiej próżni. Proces napiłania przeprowadzono podobnie jak w Rozdziale 2.3.3.

Na macierzy utworzono trzy czujniki glukozy (oparte na modyfikacji oksydazy glukozowej), na trzy kolejnych elektrodach prowadzono pomiar tlenu, a na dwóch pozostałych pomiar EIS. Schemat przedstawiono na Rysunku 4.4.



Rysunek 4.4. Schematyczne przedstawienie macierzy czujnikowej wykorzystanej w niniejszym rozdziale.

Elektrody przygotowano poprzez poddanie elektrod zanurzonych w roztworze (1) izopropanolu oraz (2) wody zdemineralizowanej działaniu ultradźwięków przez 5-10 min.

- **Pomiar oznaczania stężenia tlenu**

Monitorowanie tlenu opiera się o amperometryczną redukcję rozpuszczonego tlenu w pożywce hodowlanej na elektrodzie złotej przy potencjale -0,6 V.

Pomiar dla uzyskania krzywej kalibracji prowadzono w inkubatorze C16 (Labotect Labor Technik-Göttingen GmbH) z doprowadzeniem azotu technicznego, który regulował zawartość tlenu wewnątrz inkubatora.

Ze względu na możliwość zakażenia w hodowli komórkowej, pomiar redukcji tlenu prowadzono bez dodatkowej modyfikacji elektrod złotych. Pozwoliło to na dokładniejszą sterylizację elektrod tuż przed wysiewem komórek do układu.

- **Pomiar oznaczania stężenia glukozy**

W niniejszej pracy do oznaczania glukozy wykorzystano bioczujniki oparte o enzymatyczną reakcję rozkładu glukozy katalizowanej przez oksydazę glukozową,

która jest unieruchomiona na elektrodzie. Powstały nadtlenuk wodoru jest utleniany na elektrodzie z metalu szlachetnego^[25].

Elektrody do detekcji glukozy zmodyfikowano poprzez nakroplenie 1 μ l roztworu oksydazy glukozowej o stężeniu 1 mg/ml oraz sieciowaniu przez 10 min. w obecności aldehydu glutarowego. W przypadku komercyjnych elektrod złotych po nakropleniu roztworu elektroda była inkubowana w 20% roztworze aldehydu glutarowego przez 10 min.

- **Pomiar EIS**

Badania przeprowadzano przy napięciu 0,2 V, w zakresie częstotliwości od 50 do 150 Hz.

4.3.4. Pomiar optyczne

Pomiary optyczne detekcji tlenu w pożywce hodowlanej przeprowadzono z wykorzystaniem optody tlenowej (PyroScience) w temperaturze 37°C.

4.3.5. Przygotowanie układu do badań

Przed rozpoczęciem hodowli komórkowej elementy układu poddano procesowi sterylizacji. W tym celu elementy komory hodowlanej inkubowano przez 30 min. w 70% roztworze etanolu, a pozostałe elementy układu przemyto roztworem etanolu. Następnie wszystkie elementy (łącznie z elektrodą) poddano działaniu promieniowania ultrafioletowego pod komorą laminarną.

4.3.6. Hodowla komórkowa

W badaniach wykorzystano ludzką linię komórkową raka wątroby – HepG2 z ATCC. Komórki hodowano jako standardową monowarstwę w pożywce DMEM o niskiej zawartości glukozy (Instytut Immunologii i Techniki Doświadczalnej, Wrocław, Polska) o 10% FBS (Gibco), oraz streptomycynę [10 000 U ml⁻¹], penicylinę [10 mg ml⁻¹] 1% v/v (Sigma-Aldrich). Hodowle prowadzono w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po osiągnięciu przez komórki konfluencji na poziomie 80-90%, przeprowadzano procedurę pasażu. Do dysocjacji komórek od powierzchni używano 0,25% roztworu Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich).

Przed każdym pomiarem przeprowadzono etap pasażu komórek, a następnie określano gęstość zawiesiny komórkowej za pomocą hemacytometru. Zawiesinę

komórkową o określonej gęstości komórek wysiewano do układu pomiarowego. Po 24h przygotowano rozcieńczenia badanych związków (DMSO oraz acetaminofenon) w pożywce hodowlanej. Jako pożywkę hodowlaną stosowano pożywkę DMEM o niskiej zawartości glukozy o 10% FBS, oraz streptomycynę, penicylinę oraz amfoterycynę B [250 µg/ml] (PPA laboratories).

4.3.7. Metody oceny proliferacji i żywotności komórek

- **Test Proliferacji CTB**

W celu określenia żywych/martwych komórek, komórki inkubowano w 10% roztworze z odczynnikiem CTB (Promega) w pożywce DMEM, przez 4h w temperaturze 37°C, następnie analizowano za pomocą wielofunkcyjnego czytnika płytek Fluoroskan Acent przy długości fali wzbudzenia 544 nm i długości fali emisji 590 nm. Gęstość zawiesiny komórkowej określono za pomocą komory Bürkera. Dodatkowo przeprowadzano kontrolę negatywną (komórki z 1% Triton-X 100 (Thermo Fisher)) oraz pozytywną (komórki nie traktowane związkiem).

- **Test AlamarBlue**

W celu określenia proliferacji komórek po pomiarach elektrochemicznych wykonano test z wykorzystaniem odczynnika AlamarBlue (Bio-Rad)^[26]. Komórki w układzie pomiarowym inkubowano z 10% roztworem AlamarBlue w pożywce DMEM przez 4h w temperaturze 37°C. Równolegle na płytce 24-dółkowej przeprowadzano kontrolę pozytywną (komórki nie traktowane związkiem) oraz negatywną (komórki z 1% Triton-X 100 (Thermo Fisher)) w trzech powtórzeniach. Gęstość zawiesiny komórkowej określono za pomocą hemacytometru. Następnie po przeniesieniu inkubowanej pożywki hodowlanej na płytkę 96- dółkową, analizowano ją z wykorzystaniem czytnika płytek Synergy HTX Multi-Mode Reader przy długości fali wzbudzenia 590 nm (filtr 590/20) i długości fali emisji 560 nm (filtr 560/20).

Oba testy opierają się na przekształcaniu barwnika redoks (rezazuryny) przez żywe komórki we fluorescencyjny produkt końcowy (rezorufinę). Komórki niezdolne do życia szybko tracą zdolność metaboliczną i w związku z tym nie generują sygnału fluorescencyjnego.

4.4. Wyniki i dyskusja

Celem badań zaprezentowanych w niniejszym rozdziale była ocena opracowanej macierzy elektrodowej oraz wykorzystanego układu pomiarowego w pomiarze parametrów metabolicznych w szczególności analizy stężenia tlenu w hodowlach komórkowych.

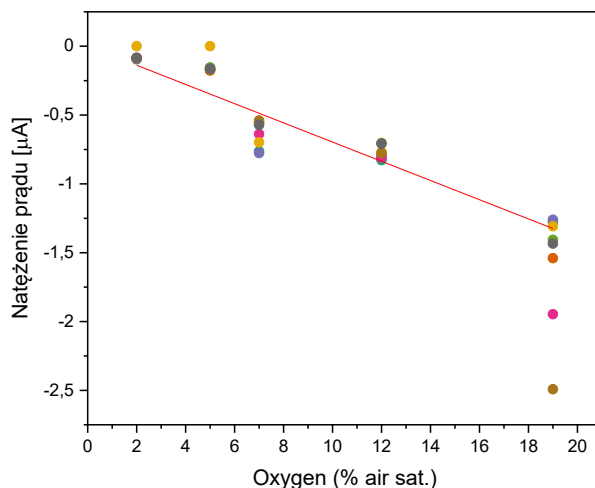
4.4.1. Możliwość wykorzystania elektrod złotych do monitorowania parametrów metabolicznych komórek w pożywce hodowlanej

4.4.1.1. Możliwość wykorzystania elektrod złotych do oznaczania tlenu cząsteczkowego w pożywce hodowlanej

W pierwszym etapie badań oceniono możliwość wykorzystania złotych elektrod wykonanych w procesie napylenia w próżni do monitorowania zmian zawartości tlenu w pożywce hodowlanej. Najpierw wyznaczono krzywą kalibracji w pożywce hodowlanej dla kolejnych stężeń tlenu: 21%, 12,5%, 7%, 5%, 1%, a następnie sprawdzono trzykrotnie odpowiedź elektrod dla dwóch różnych stężeń tlenu 12,5% oraz 7%.

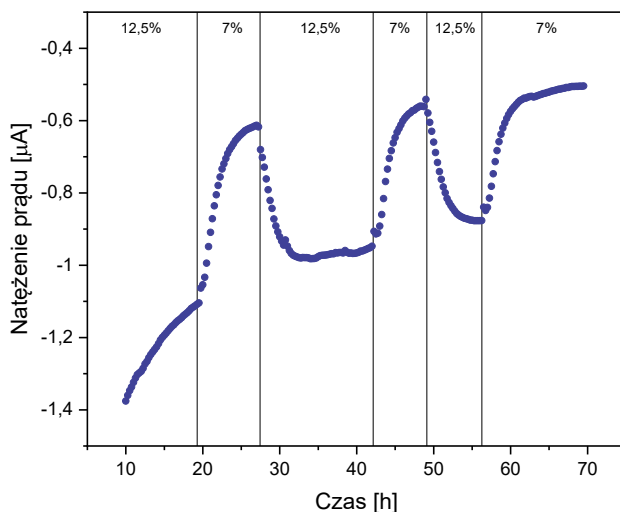
Monitorowanie tlenu opiera się o amperometryczną redukcję rozpuszczonego tlenu w pożywce hodowlanej na elektrodzie złotej przy potencjale -0,6 V. Został on wybrany w oparciu o badania opisane w Rozdziale 2. Pomiar prowadzono w odstępie 15 min., przez 8 h dla każdego kolejnego stężenia.

Na Rysunku 4.5. przedstawiono krzywą kalibracji dla elektrod znajdujących się na jednej macierzy. Czułość elektrod w temperaturze 37°C wyniosła $-76,8 \pm 6,5$ nA/% zawartości tlenu inkubatorze (dla $n=6$). Zakładając, że przy 1% tlenu w powietrzu w inkubatorze, w pożywce hodowlanej jest 10 μ M tlenu rozpuszczonego w pożywce^[27,28], czułość elektrod wynosi $-7,7 \pm 0,6$ nA/ μ M.



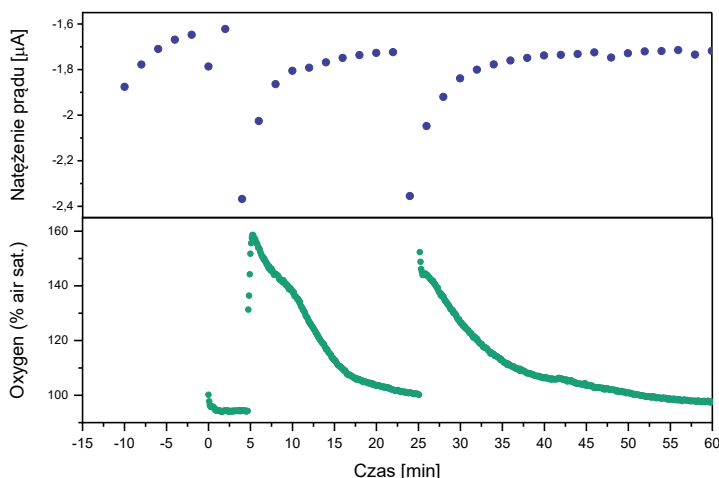
Rysunek 4.5. Krzywa kalibracji uzyskana dla elektrod złotych wytworzonych w procesie napyłania w wysokiej próżni w pożywce hodowlanej.

Na Rysunku 4.6. można zaobserwować odpowiedź dla elektrod dla dwóch różnych stężeń tlenu podczas 70h pomiaru. Przy każdej kolejnej zmianie stężenia różnica się zmniejszała i wynosiła kolejno $-0,59 \pm 0,12 \mu\text{A}$; $-0,56 \pm 0,07 \mu\text{A}$ $0,55 \pm 0,5 \mu\text{A}$, w czasie 6,25h (dla $n=8$). Obserwowany jest ciągły spadek czułości, co prawdopodobnie wynika z adsorpcji na powierzchni elektrod cząsteczek obecnych w pożywce hodowlanej. Można zatem zauważyć jak istotne jest pokrycie elektrod warstwą przeciwporostową, która umożliwi kilkudniowe pomiary a jednocześnie nie wpłynie negatywnie na czułość wykorzystywanych czujników.



Rysunek 4.6. Odpowiedź elektrod złotych dla pomiaru w dwóch różnych stężeniach 12,5% oraz 7% w pożywce hodowlanej. Potencjał redukcji tlenu $-0,6 \text{ V}$.

W celu potwierdzenia działania elektrod przeprowadzono również równoległy pomiar metodą optyczną z wykorzystaniem optody tlenowej. Na Rysunku 4.7. można zaobserwować równoległy skok natężenia prądu zarejestrowany na woltamperogramie oraz wartości tlenu dla optody podczas dodawania natlenowanego roztworu do roztworu pomiarowego. Pomiar przeprowadzano w roztworze buforowym PBS o pH 7,4.



Rysunek 4.7. Porównanie działania optody tlenowej (kolor zielony) oraz pomiaru reakcji redukcji tlenu na elektrodzie złotej (kolor niebieski) wytworzonej w procesie napyłania w wysokiej próżni w roztworze buforowym PBS o pH 7,4. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.

Powyższe wyniki potwierdzają możliwość użycia elektrod złotych wytworzonych w procesie napyłania w wysokiej próżni do monitorowania zmian stężenia tlenu w pożywce hodowlanej. W trakcie kalibracji zauważono, że czas stabilizacji elektrod podczas wymuszonych zmian stężenia tlenu jest dość długi (ponad 8h), dlatego wydaje się ważne aby podczas kolejnych pomiarów w hodowli komórkowej czas pomiędzy wysiewem komórek, a zmianą pożywki lub dodatkiem związku był możliwie wydłużony.

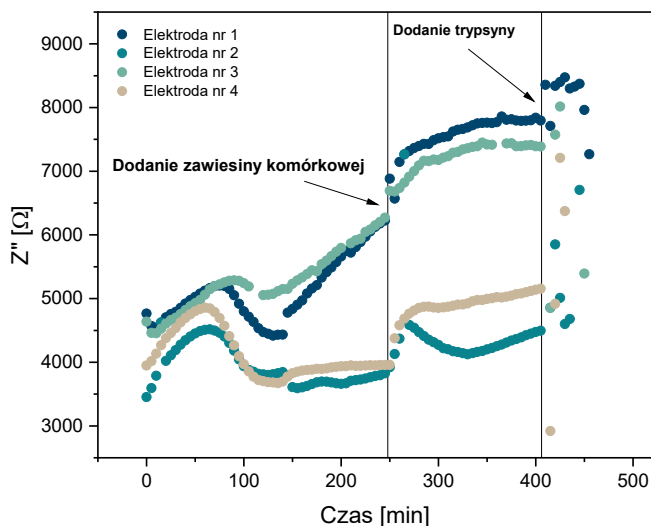
4.4.1.2. Wykorzystanie pomiarów elektrochemicznej impedancji spektroskopowej (EIS) w hodowli komórkowej

Wykorzystanie elektrod ITO w pomiarze elektrochemicznej impedancji spektroskopowej w monitorowaniu adhezji komórek na powierzchni elektrod zostało potwierdzone przez dr Karthikę Kappalakandy Valapil^[24,29]. W niniejszej pracy, do identycznego pomiaru wykorzystano elektrody złote, przede wszystkim ze względu na uproszczenie procesu fabrykacji macierzy elektrod jak opisano w Rozdziale

2.4.2.1. W pomiarach wykorzystano te same parametry pomiarowe, badania przeprowadzono przy napięciu 0,2 V, w zakresie częstotliwości od 50 do 150 Hz.

Pomiary były prowadzone z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^6 komórek/ml, która została dodana po 4h pomiaru EIS w samej pożywce hodowlanej. Pod koniec pomiaru dodawano trypsynę (enzym proteolityczny) w celu dysocjacji komórek, czyli ich odłączenia od powierzchni. Standardowo trypsyna jest wykorzystywana w procesie pasażowania, czyli procesie przenoszenia komórek do nowej butelki hodowlanej. Wytworzone wiązania peptydowe pomiędzy białkami adhezyjnymi, a powierzchnią naczyń hodowlanych są rozcinane, umożliwiając przeniesienie komórek do nowej butelki.

Wyniki przedstawione na Rysunku 4.8. potwierdzają możliwość użycia elektrod złotych wytworzonych w procesie napylenia w wysokiej próżni do monitorowania zmian adhezji komórek na powierzchni elektrod w hodowli komórkowej. Pomiar był prowadzony na czterech elektrodach, jednak uzyskano odmienny sygnał. Prawdopodobnie było to spowodowane nierównomiernym rozłożeniem komórek w całej komorze hodowlanej. Konstrukcja górnego elementu komory hodowlanej, z założenia uniemożliwia równomierne rozłożenie komórek, zatem będzie to widoczne na otrzymanym sygnale impedancji. W pierwszym etapie pomiaru w pożywce hodowlanej na dwóch elektrodach po 4h uzyskano stabilizację sygnału (elektroda nr 4 i 2), natomiast na dwóch kolejnych (elektroda nr 1 i 3) sygnał miał tendencję wzrostową. Podobny sygnał uzyskano dla elektrod ITO w pożywce hodowlanej. Po dodaniu zawiesiny komórkowej widzimy skok sygnału, a następnie stabilizację sygnału dla trzech elektrod. Dodanie trypsyny spowodowało zmianę sygnału, chociaż nie uzyskano spodziewanego sygnału jak w przypadku elektrod ITO^[29]. Zauważono mniejszą powtarzalność sygnału w przypadku elektrod złotych w porównaniu do elektrod ITO. Jednym z powodów mógł być delikatniejszy proces czyszczenia elektrod złotych, ze względu na wrażliwość napyłonej warstwy.

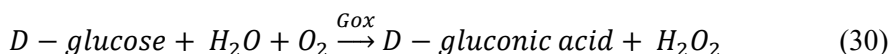


Rysunek 4.8. Pomiar impedancji na elektrodzie złotej podczas hodowli komórek linii HepG2. Częstotliwość 72,1 Hz.

4.4.1.3. Możliwość wykorzystania elektrod złotych w pomiarach stężenia glukozy

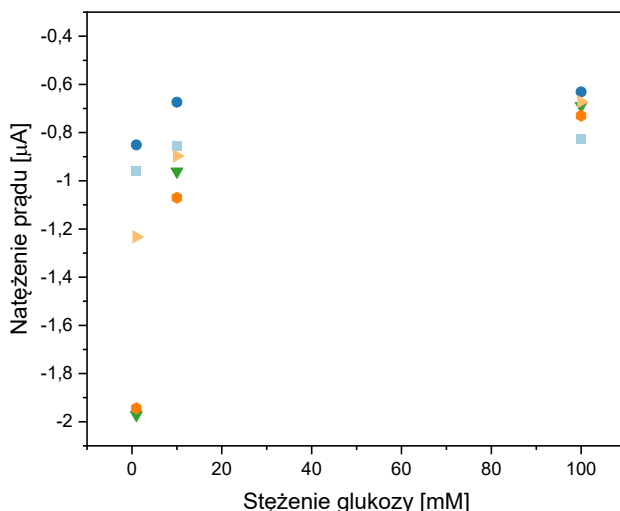
Na tym etapie badań oceniono możliwość wykorzystania złotych elektrod wykonanych w procesie napylenia w próżni do monitorowania stężenia glukozy w pożywce hodowlanej.

Rozkład glukozy zachodzi według poniższego równania (30):



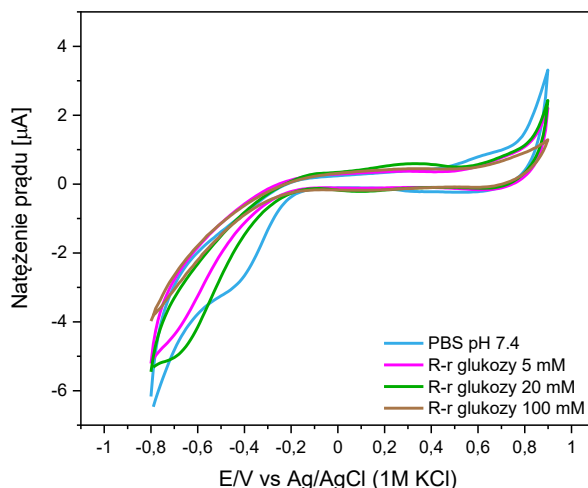
W pierwszym etapie wytwarzany jest nadtlenek wodoru, który następnie jest rozkładany na elektrodzie złotej. Na podstawie pomiaru techniką woltamperometrii cyklicznej z wykorzystaniem komercyjnych elektrod złotych w roztworze buforowym do którego był dodawany nadtlenek wodoru wyznaczono potencjał utleniania H_2O_2 -0,3 V.

W dalszym kroku wyznaczono krzywą kalibracji (Rysunek 4.9.) dla kolejnych stężeń: 1 mM, 10 mM oraz 100 mM z wykorzystaniem dla elektrod złotych modyfikowanych glukozą. Dla 5 elektrod uzyskano podobny sygnał, jednak był on odwrotny do spodziewanego. Dla stężenia 100 mM uzyskano niższe wartości natężenia prądu niż należało by się spodziewać, a więc krzywa powinna przebiegać w odwrotną stronę.



Rysunek 4.9. Krzywa kalibracji dla elektrod złotych wytworzonych w procesie napyłania w wysokiej próżni modyfikowanych oksydazą glukozową. Potencjał utleniania H_2O_2 -0,3 V.

Przeprowadzono zatem dodatkowy pomiar techniką woltamperometrii cyklicznej w roztworze buforowym PBS o pH 7,4, i następnie z roztworem glukozy o stężeniach 5 mM, 20 mM oraz 100 mM. Jak widać na przedstawionym na Rysunku 4.10. woltamperogramie zaobserwowano sygnał redukcji tlenu, dla którego potencjał początku fali katalitycznej redukcji tlenu wynosił -0,2 V. Zatem wyznaczony potencjał dla redukcji nadtlenu wodoru jednocześnie mieścił się w zakresie wartości potencjału dla redukcji tlenu. Mierzona odpowiedź dla opracowanych czujników była prawdopodobnie bezpośrednio sygnałem tlenu, ponieważ enzymatyczne utlenianie glukozy opisane w równaniu (30) zużywa tlen, zmiana natężenia prądu redukcji tlenu nadal może być miarą ilości glukozy w roztworze, jak pokazano na Rysunku 4.10.



Rysunek 4.10. Woltamperogram cykliczny uzyskany na elektrodzie złotej w roztworze buforowym PBS o pH 7,4 oraz w roztworach glukozy o stężeniach 5 mM, 20 mM, 100 mM. Szybkość zmian potencjału 40 mV/s.

4.4.2. Monitorowanie parametrów metabolicznych metodą elektrochemiczną w hodowli komórkowej HepG2

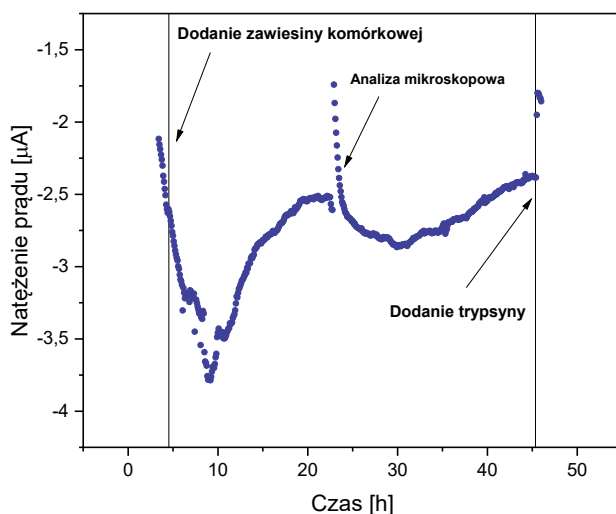
W pierwszym etapie prowadzonych badań przeprowadzono pomiary elektrochemiczne oznaczenia tlenu cząsteczkowego w pożywce hodowlanej w warunkach kontrolnych. Pomiar prowadzono przez 48 h, początkowo jedynie w pożywce hodowlanej, do której po 4 h dodano zawiesinę komórkową o gęstości 1×10^6 komórek/ml. W końcowym etapie dodano trypsynę podobnie jak w poprzednich pomiarach z wykorzystaniem EIS.

Analizując uzyskane wyniki (Rysunek 4.11.) można zauważyć początkowy wzrost wartości natężenia prądu (wartości natężenia prądu mają znak ujemny, gdyż związane są z reakcją redukcji tlenu na powierzchni elektrody, czyli procesem katodowym), a więc wzrost lokalnego stężenia tlenu przy powierzchni elektrody. Prawdopodobnie jest to wynik dodatku zawiesiny komórkowej w świeżej pożywce, a więc również zmiany temperatury pożywki w samym układzie, co wpływa na natężenie prądu. W tym czasie następuje proces opadania komórek na dno układu oraz adhezji komórek do podłoża. Zatem lokalne stężenie zmieni się dopiero w momencie w którym wszystkie komórki przyczepią się prawidłowo do dna komory hodowlanej. Po około 5h od momentu dodania zawiesiny komórkowej obserwowano spadek wartości natężenia prądu, czyli spadek stężenia tlenu przy powierzchni elektrody.

Pomiar prowadzono na ośmiu elektrodach i na wszystkich obserwowano ten sam trend odpowiedzi prądowej podczas pomiaru.

Po analizie mikroskopowej (około 22h pomiaru) ponownie zarejestrowano wzrost wartości natężenia prądu (od 22h do 30h trwania eksperymentu), a następnie jego spadek (po 30h trwania pomiarów). Zmiany te są zarówno spowodowane zmianą temperatury w układzie, po ponownym umieszczeniu układu w inkubatorze, jak i wynikiem dyfuzji tlenu przez PDMS. Między 30, a 45 godziną pomiaru widać bezpośredni wpływ zużycia tlenu przez komórki. Warto nadmienić, że hepatocyty wykazują wysokie zapotrzebowanie na tlen^[30]. Dodatkowo badania literaturowe wskazują na znaczną różnicę w zmierzonych wartościach stężenia tlenu na dnie hodowli komórkowej^[28] oraz dla ustawień inkubatora hodowlanego.

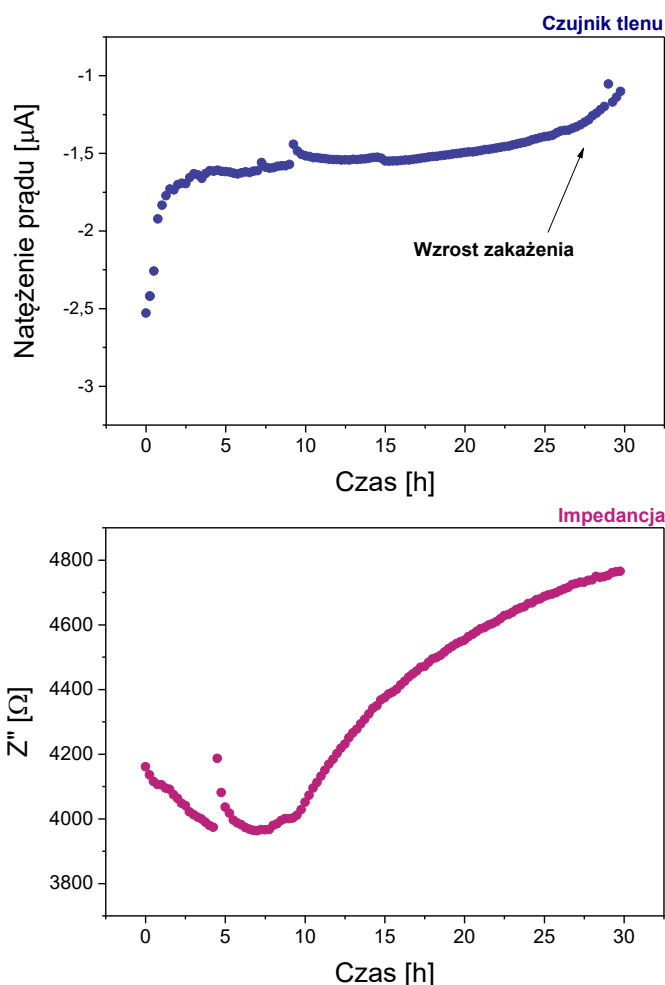
Ważnym aspektem pomiarów elektrochemicznych jest to, że natężenie prądu elektrodowego zależy od zmiany temperatur. Istotną kwestią jest czułość elektrod na zmianę temperatury, jak również na otwieranie/zamykanie drzwiczek od inkubatora, a nawet niezamierzone poruszenie kabli.



Rysunek 4.11. Rejestracja natężenia prądu dla czujnika tlenu podczas 48h hodowli komórek linii HepG2 w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂). Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.

Spadek stężenia tlenu może być również skutkiem pojawienia się zakażenia w hodowli komórkowej lub układzie pomiarowym, dlatego bardzo ważna jest dokładna sterylizacja układu przed pomiarem, a także możliwość analizy mikroskopowej układu w trakcie trwania eksperymentu. W trakcie jednego z pomiarów zauważono spadek stężenia tlenu (spadek wartości natężenia prądu) oraz

gwałtowny wzrost mierzonych wartości EIS (Rysunek 4.12.), a dodatkowa analiza mikroskopowa po zakończeniu pomiaru wykazała dużą ilość komórek grzybów w układzie. Z tego powodu w dalszych badaniach stosowano dodatkowy antybiotyk w pożywce hodowlanej – amfoterycynę B, a pomiar zaczynano już po wysianiu komórek w układzie.



Rysunek 4.12. Zestawienie wyników uzyskanych dla czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas hodowli komórek linii HepG2 w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂) w której pojawiło się zakażenie grzybicze. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.

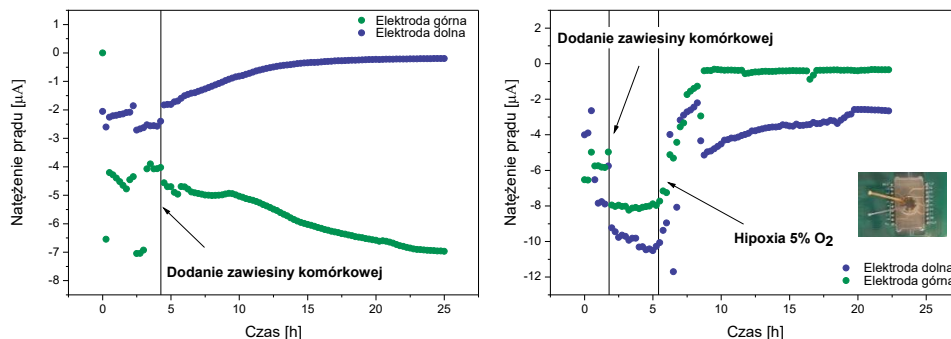
Amfoterycyna B jest polienowym antybiotykiem stosowanym w celu zapobiegania zakażeń grzybami i drożdżami^[31]. Mechanizm działania polega na wiązaniu hydrofobowej części cząsteczki amfoterycyny B z częścią ergosterolową błony komórkowej grzyba tworząc agregat, który tworzy kanały transbłonowe.

Depolaryzacja błony, wzrost jej przepuszczalności dla protonów i kationów jednowartościowych oraz stabilizacja kanałów przez utworzenie dodatkowych wiązań wodorowych powoduje spadek aktywności, wyciek cytoplazmy i śmierć komórki grzyba^[32]. Amfoterycyna B może wykazywać działanie toksyczne^[33], jednak ze względu na nawracające zakażenia na tym etapie prac, uznano że zastosowanie dodatkowego antybiotyku przewyższa potencjalne ryzyko zwiększenia toksyczności dla komórek pozwalając osiągnąć główny cel pracy jakim jest ocena możliwości działania samych elektrod w hodowli komórkowej.

Na tym przykładzie widać jak bardzo ważna jest praca z hodowlą *in vitro* w sterylnych warunkach. Zakażenia mogą się pojawiać w wyniku użycia niesterylnych materiałów, podczas pracy pod komorą laminarną w której nie są zmieniane regularnie filtry lub nawet mogą zostać przeniesione z innej hodowli w inkubatorze hodowlanym.

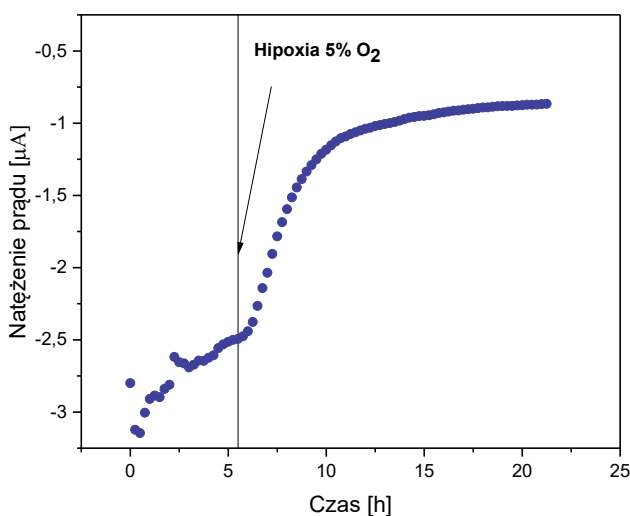
W trakcie badań sprawdzono również sygnał pochodzący od elektrod znajdujący się na dwóch różnych wysokościach. Dodatkowe elektrody napyłone na folii umieszczono pomiędzy elementem PDMS a dodatkowym fragmentem komory hodowlanej w której umieszczana jest elektroda odniesienia. Najpierw sprawdzono ich odpowiedź w standardowych warunkach hodowlanych (21% O₂, 5% CO₂), a następnie w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂).

Podczas analizy wyników (Rysunek 4.13.) stwierdzono znacząco różne natężenie przepływającego prądu. Wynika to z różnych materiałów, na które została napyłona warstwa złota. Wyraźnie widać, że w trakcie, gdy stężenie tlenu na powierzchni komory hodowlanej maleje, to na wysokości 6 mm rejestrowane stężenie tlenu rośnie. Ciągły wzrost jest prawdopodobnie spowodowany procesem parowania, a więc zmniejszenia się warstwy dyfuzyjnej. Istotny jest również fakt, że komórki występują jedynie na powierzchni komory hodowlanej, a więc obecny tlen w warstwie przyelektrodowej elektrody górnej nie jest zużywany. Ciekawy jest również fakt, że dla elektrody górnej w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂), obserwowany sygnał jest stały, podczas gdy elektroda na powierzchni komory hodowlanej rejestruje ciągły wzrost zużycia tlenu.



Rysunek 4.13. Rejestracja natężenia prądu dla czujników tlenu podczas 25h hodowli komórek linii HepG2 w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂) oraz przy obniżonym stężeniu tlenu (37°C, 5% O₂, 5% CO₂) dla elektrod znajdujących się na różnych wysokościach. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.

Na Rysunku 4.14. pokazano pomiar kontrolny (bez komórek) w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂). Kształt uzyskanej krzywej jest podobny do krzywej uzyskanej podczas kalibracji elektrod. Czas odpowiedzi wynosi około 6h.



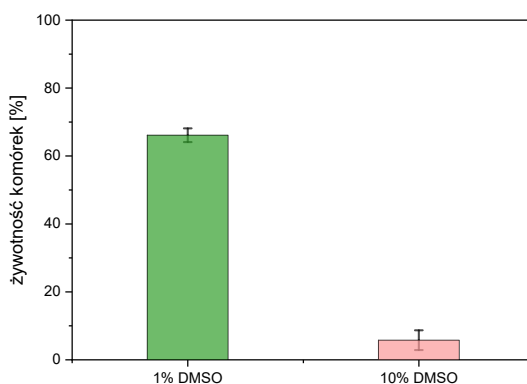
Rysunek 4.14. Pomiar kontrolny (bez komórek) w warunkach obniżonego stężenia tlenu (37°C, 5% O₂, 5% CO₂). Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.

4.4.2.1. Wpływ roztworu DMSO na żywotność komórek linii HepG2

W przypadku leków terapeutycznych, które są nierozpuszczalne w wodzie stosuje się rozpuszczalniki organiczne takie jak DMSO, etanol lub metanol^[34]. DMSO jest szeroko stosowane w badaniach *in vitro* m.in. do krioprezerwacji komórek ze względu na wysoką temperaturę zamrażania^[35] oraz rozcieńczanie leków ze względu na silne oddziaływanie z fosfolipidami wspomagające dostarczenie leków przez błony komórkowe, pomimo możliwych efektów cytotoksycznych na komórki^[36].

Różne typy komórek mogą reagować w odmienny sposób na działanie rozpuszczalników. Znaczący wpływ ma dodatkowo stężenie podawanego rozpuszczalnika. W celu określenia wpływu DMSO na komórki HepG2 badania rozpoczęto od testów wstępnych z wykorzystaniem płytki 96-dółkowej. Test prowadzono z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^5 komórek/ml, a ocenę wpływu DMSO przeprowadzono po 24h od wysiania komórek. Komórki inkubowano z roztworem DMSO o stężeniach 1% oraz 10% przez 24h. Stężenia wybrano na podstawie literatury^[36]. W celu określenia proliferacji i żywotności komórek w otrzymanych przeprowadzono test z wykorzystaniem barwnika CTB.

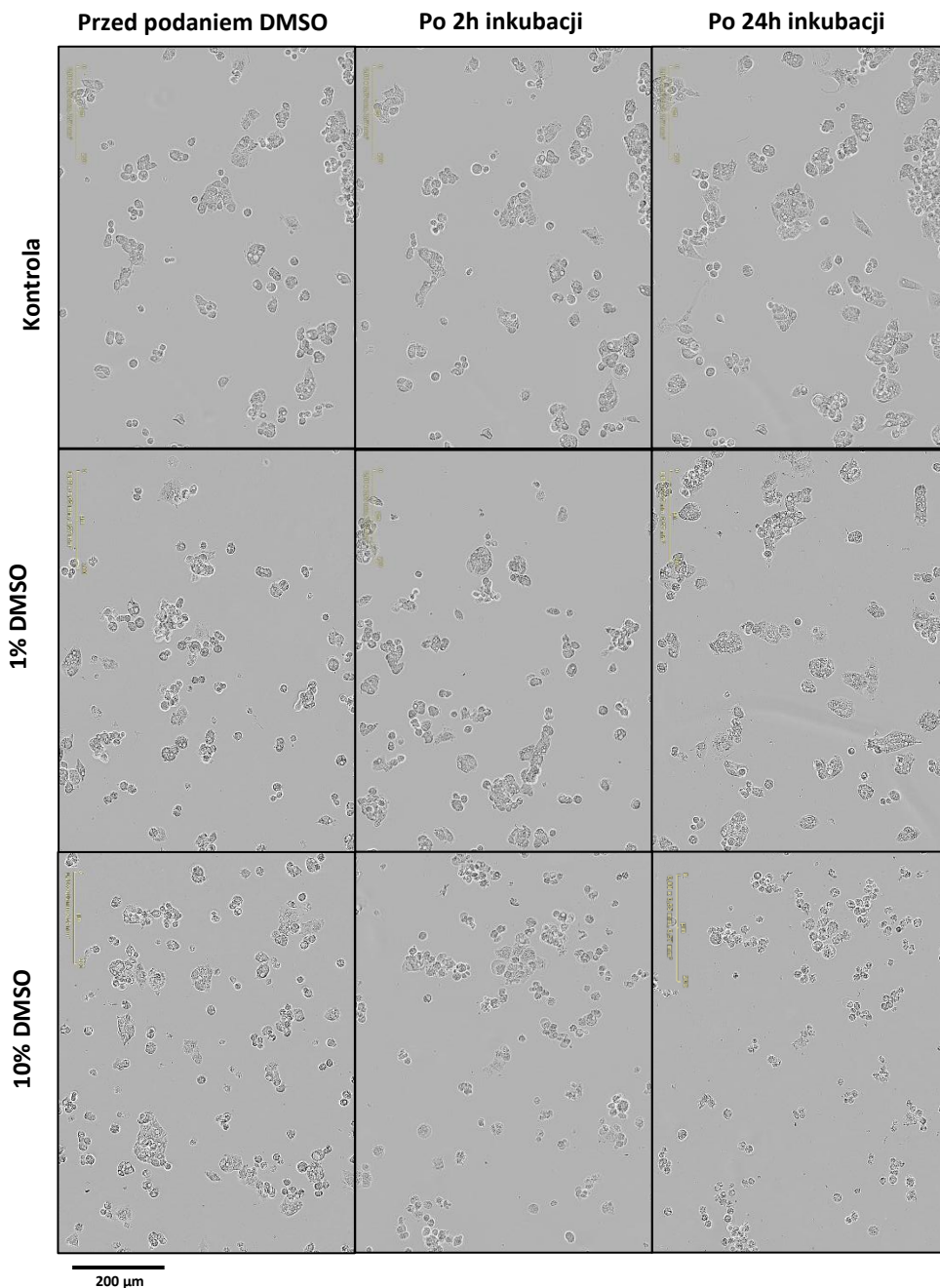
Otrzymane wyniki badań (Rysunek 4.15.) potwierdzają toksyczny wpływ 10% roztworu DMSO na żywotność komórek linii HepG2. Zaobserwowano wyraźny spadek żywotności komórek o prawie 98% w stosunku do kontroli. Natomiast podanie 1% DMSO spowodowało spadek żywotności komórek tylko o 35%.



Rysunek 4.15. Wpływ DMSO na żywotność komórek linii HepG2 na płytce 96-dółkowej w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.

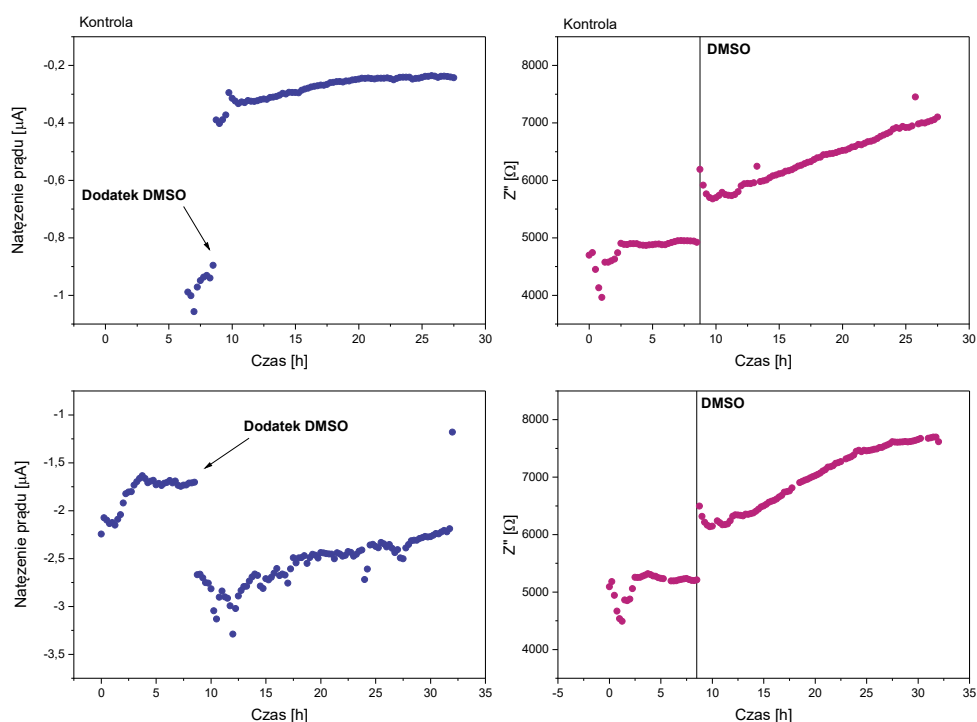
Na Rysunku 4.16. przedstawiono zdjęcia komórek linii HepG2 przed podaniem oraz po 2h i 24h inkubacji z DMSO. Na zdjęciach wyraźnie widać wpływ 10% DMSO na komórki. Na zdjęciu po 2h widać można dostrzec małe pęcherzyki tzw. ciała apoptyczne świadczące o procesie apoptozy. Po 24h można dostrzec pojedyncze ciała apoptyczne. Dominują komórki o zmniejszonym okrągłym kształcie, nie tworzące spójnych agregatów jak w przypadku żywych komórek linii HepG2. Porównanie pojedynczych zdjęć dla kontroli i dla 1% DMSO może wydać się podobne. W przypadku 1% DMSO po 2h inkubacji widać pojedyncze ciała apoptyczne, natomiast po 24h inkubacji są one niewidoczne. Można natomiast dostrzec rozplaszczony kształt komórek oraz formujące się agregaty.

Analiza mikroskopowa jest szczególnie ważna w przypadku podawania związków o nieznanym mechanizmie działania. W krótkich odstępach czasowych pozwala na obserwację drobnych zmian niewidocznych po długim czasie inkubacji.



Rysunek 4.16. Zestawienie zdjęć z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ DMSO o stężeniu 1% oraz 10% na morfologię komórek linii HepG2 po 24h ekspozycji komórek na DMSO na płytce 96-dołkowej w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂). Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius) pozwalającym na jednoczesną inkubację i analizę mikroskopową. Skala 200 μ m.

W następnym etapie badań przeprowadzono pomiary elektrochemiczne oznaczania tlenu cząsteczkowego w pożywce hodowlanej (cztery elektrody) oraz pomiary EIS do porównania adhezji komórek na powierzchni elektrod (cztery elektrody). Pomiary prowadzono z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^5 komórek/ml, a ocenę wpływu DMSO przeprowadzono po 8h od wysiania komórek. Komórki inkubowano z roztworem DMSO o stężeniu 10% przez 24h. Stężenie wybrano na podstawie wcześniejszych badań z wykorzystaniem barwnika CTB. Założono, że otrzymany sygnał odda toksyczny wpływ na komórki linii HepG2 i posłuży jako kontrola negatywna do dalszych badań. Dodatkowo przeprowadzono pomiar kontrolny bez wysiewu komórek, z podaniem 10% DMSO do komory hodowlanej. Wyniki przedstawiono na Rysunku 4.17.



Rysunek 4.17. Zestawienie wyników uzyskanych z czujników tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas kontroli (bez komórek) oraz 32h hodowli komórek linii HepG2 podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z 10% roztworem DMSO.

W przypadku czujników tlenu w hodowli w trakcie pierwszych 8h obserwowano spadek wartości natężenia prądu. Następnie po dodaniu DMSO obserwowano gwałtowny wzrost wartości natężenia prądu trwający ok 3,5h, a potem jego powolny spadek. Wzrost wartości natężenia prądu świadczy o wzroście lokalnego stężenia tlenu cząsteczkowego przy powierzchni elektrody. Podczas oddychania

komórkowego tlenu jest pobierany z otoczenia przez komórki, natomiast podczas wymuszonej apoptozy następuje gwałtowne zahamowanie zużycia tlenu, zatem wzrost stężenia tlenu spowodowany jest prawdopodobnie apoptozą większości komórek. Podczas pomiaru kontrolnego (bez komórek) zaobserwowano skok natężenia prądu, a później stabilizację natężenia prądu i powolny spadek.

W przypadku pomiarów EIS w obu przypadkach zarejestrowano najpierw stabilny sygnał, a następnie po dodaniu 10% DMSO wzrost wartości impedancji przez kolejne 24h. Poprzednie badania, a także dane literaturowe potwierdzają toksyczny wpływ 10% stężenia DMSO na komórki linii HepG2. Z tego względu można przypuszczać, że sygnał EIS otrzymany po dodaniu DMSO jest związany z dodatkiem samego związku i zmianą przewodności roztworu.

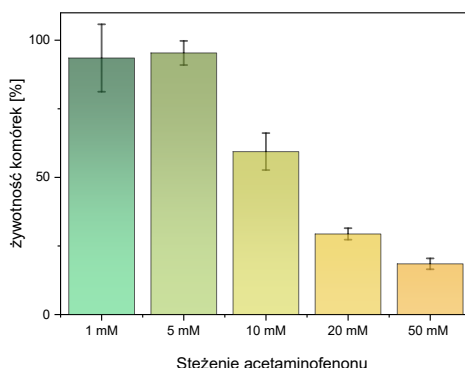
Z obserwacji pomiarów przedstawionych na Rysunkach 4.17., 4.12. oraz 4.8. można zauważyć, że metoda EIS jest metodą bardzo czułą na każdą nawet najmniejszą zmianę w układzie pomiarowym. Dodanie do pożywki badanych leków, trypsyny czy pożywki hodowlanej będzie wpływało na zmianę siły jonowej w roztworze, a co za tym idzie zmianę przewodności roztworu. Z tego względu konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań oddzielnie dla każdej podawanej substancji, szczególnie w pożywce hodowlanej, której skład jest bogaty w białka, cukry, antybiotyki, które dodatkowo wraz z upływem czasu mogą sedymentować na dno i być przyczyną niezamierzonej adsorpcji na powierzchni elektrod (tzw. antifoulingu).

4.4.2.2. Wpływ acetaminofenu na żywotność komórek linii HepG2

Jednym ze związków, który działa toksycznie na wątrobę jest acetaminofenon. Jest to hydroksylowa pochodna acetanilidu. Znany pod różną nazwą handlową, stosowany jest jako lek o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. Może prowadzić do trwałego uszkodzenia wątroby, gdy będzie podawany w wysokich dawkach^[37]. W celu określenia wpływu acetaminofenu na komórki linii HepG2 badania rozpoczęto od przeprowadzenia testu żywotności z wykorzystaniem płytki 96-dółkowej.

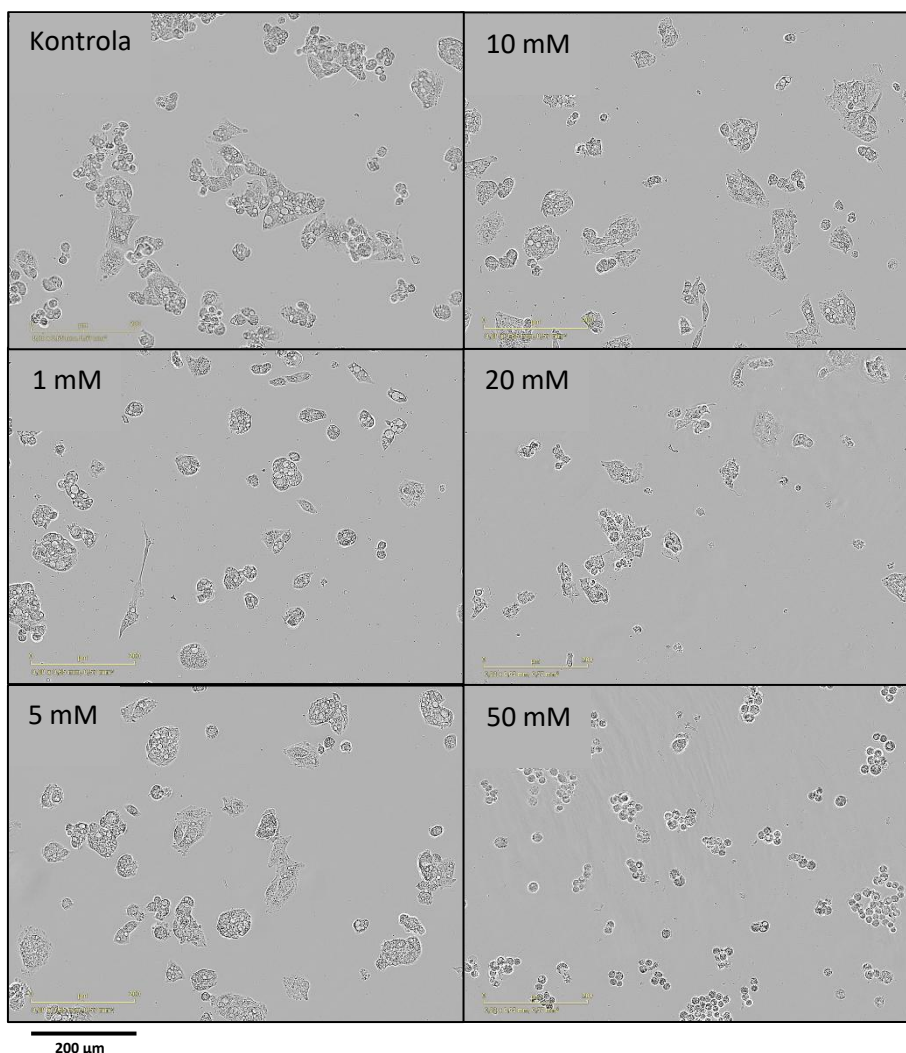
Test prowadzono z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^5 komórek/ml, a ocenę wpływu acetaminofenu przeprowadzono po 24h od wysiania komórek. Komórki inkubowano z roztworem acetaminofenu o stężeniach 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM oraz 50 mM przez 24h. Stężenia wybrano na podstawie literatury^[38–40]. W celu określenia proliferacji i żywotności komórek przeprowadzono test z wykorzystaniem barwnika CTB.

Analiza uzyskanych wyników (Rysunek 4.18.) potwierdziła toksyczny wpływ acetaminofenonu na komórki linii HepG2. Zauważono, że wraz z podaniem większego stężenia związku, uzyskiwano mniejszą żywotność komórek. Podanie acetaminofenonu o stężeniu 50 mM najbardziej wpłynęło na żywotność komórek, która wyniosła 20%. Przy stężeniu 1 mM oraz 5 mM efekt toksyczny był prawie niezauważalny i porównywalny z kontrolą (komórki bez podania związku).



Rysunek 4.18. Wpływ acetaminofenonu na żywotność komórek linii HepG2 na płycie 96-dółkowej w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.

Na Rysunku 4.19. przedstawiono zdjęcia komórek linii HepG2 po 24h inkubacji z acetaminofenonem. Na zdjęciach obrazujących wpływ niskich stężeń (1 mM, 5 mM, 10 mM) zmiany są prawie niewidoczne. Można zaobserwować rozplaszczony kształt komórek oraz formujące się agregaty. Dla stężenia 20 mM można zaobserwować zmniejszoną liczbę komórek w porównaniu do kontroli. Obecne są żywe komórki o spłaszczonym kształcie. Natomiast wyraźnie widać wpływ 50 mM związku. Komórki mają zmniejszony, okrągły kształt. Są one podobne do komórek po inkubacji z 10% DMSO.

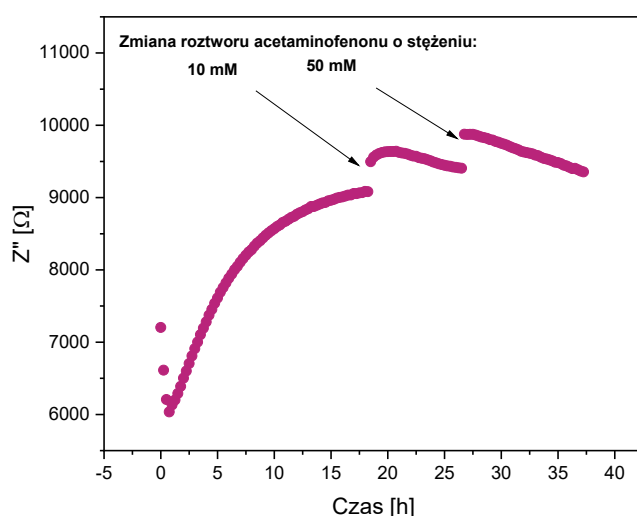


Rysunek 4.19. Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ acetaminofenonu o stężeniach 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM oraz 50 mM na morfologię komórek linii HepG2 na płytce 96-dołkowej w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO₂). Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius) pozwalającym na jednoczesną inkubację i analizę mikroskopową. Skala 200 µm.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizy zmiany stężenia tlenu i glukozy w pożywce hodowlanej poprzez pomiary elektrochemiczne oraz pomiary EIS do porównania adhezji komórek na powierzchni elektrod w hodowli komórkowej linii HepG2 podczas inkubacji z roztworem acetaminofenonu o stężeniach 1 mM, 10 mM oraz 50 mM. Zostały one wybrane na podstawie literatury oraz wcześniej

przeprowadzonego testu na żywotność komórek z wykorzystaniem odczynnika CTB (Rysunek 4.18.). Wybrano dwa skrajne stężenia dla których uzyskano znacznie różniącą się żywotność. Dodatkowo postanowiono przeprowadzić pomiar z użyciem stężenia 10 mM, aby sprawdzić możliwość rozróżnienia sygnału przy różnych wartościach żywotności komórek.

Na początku przeprowadzono pomiar kontrolny aby ocenić wpływ acetaminofenu na zmianę przewodności roztworu. Pomiar EIS był prowadzony w pożywce hodowlanej z dodaniem roztworu acetaminofenu o stężeniu 10 mM oraz 50 mM. Na Rysunku 4.20. możemy zaobserwować skok impedancji w momencie podania roztworu do układu, który był również widoczny podczas dodania DMSO do roztworu (Rysunek 4.17.). Po podaniu związku do roztworu obserwowano spadek wartości impedancji.



Rysunek 4.20. Wpływ dodania roztworu acetaminofenu o stężeniu 10 mM oraz 50 mM na pomiar impedancji w pożywce hodowlanej.

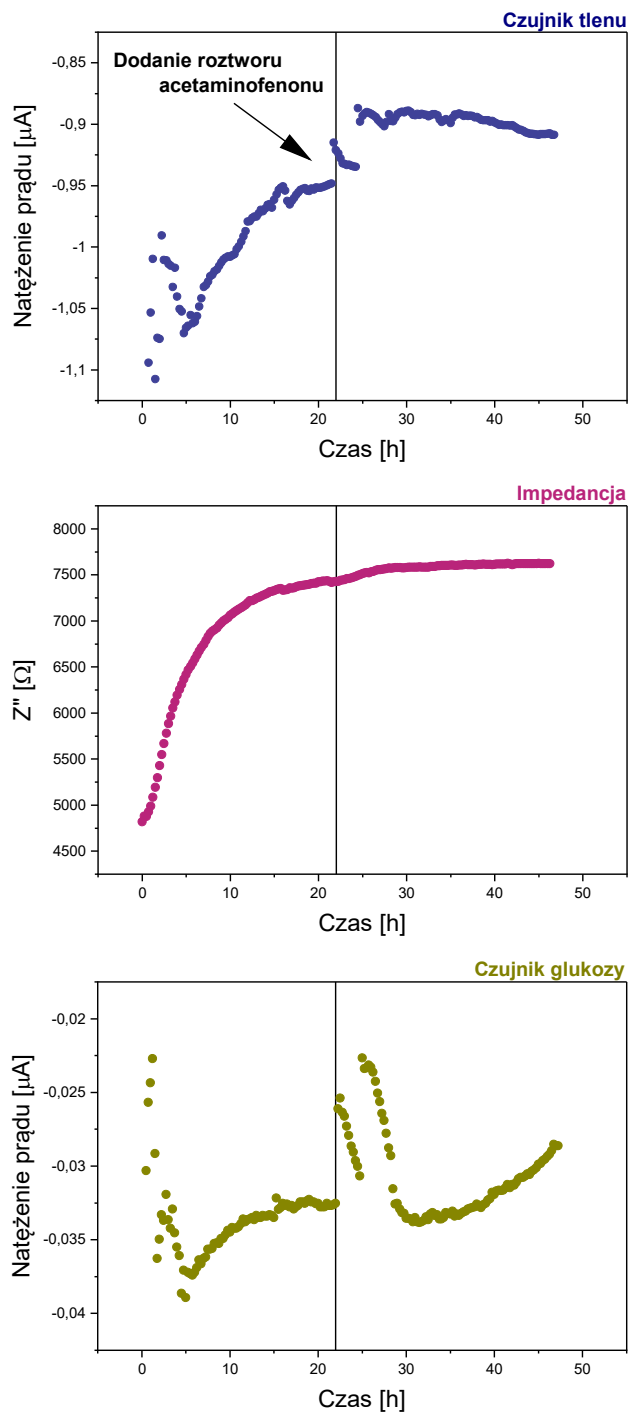
Ocenę wpływu acetaminofenu na komórki linii HepG2 prowadzono z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^5 komórek/ml, która była wprowadzona do układu pod komorą laminarną. Pomiary prowadzono przez 48h, a ocenę wpływu przeprowadzano po 24h od wysiania komórek do układu. Analiza mikroskopowa była prowadzona przed włączeniem pomiaru, aby sprawdzić obecność komórek na dnie komory hodowlanej, a także po jego zakończeniu. Następnie przeprowadzono test z wykorzystaniem odczynnika AlamarBlue. Tak jak pokazano na Rysunku 4.4. wykorzystano macierz 8-elektrodową. Pomiar stężenia tlenu prowadzono na trzech elektrodach, pomiar stężenia glukozy na trzech elektrodach i pomiar EIS na pozostałych dwóch. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 4.21-4.24.

W przypadku czujników tlenu w trakcie pierwszych 24h zaobserwowano ciągły spadek wartości natężenia prądu dla wybranych stężeń związku. Można było również zaobserwować podobny trend wahań natężenia prądowego, obserwowany dla pomiarów w hodowli komórek linii HepG2 (Rysunek 4.10.). Następnie po dodaniu roztworu acetaminofenonu, obserwowano skok natężenia prądu dla wszystkich pomiarów. W przypadku stężenia 1 mM oraz 50 mM obserwowano dość stabilny sygnał przez pierwsze godziny po podaniu związku. Dla stężenia 10 mM obserwowano dalszy logarytmiczny wzrost natężenia prądu, który po 10h zaczął się stabilizować.

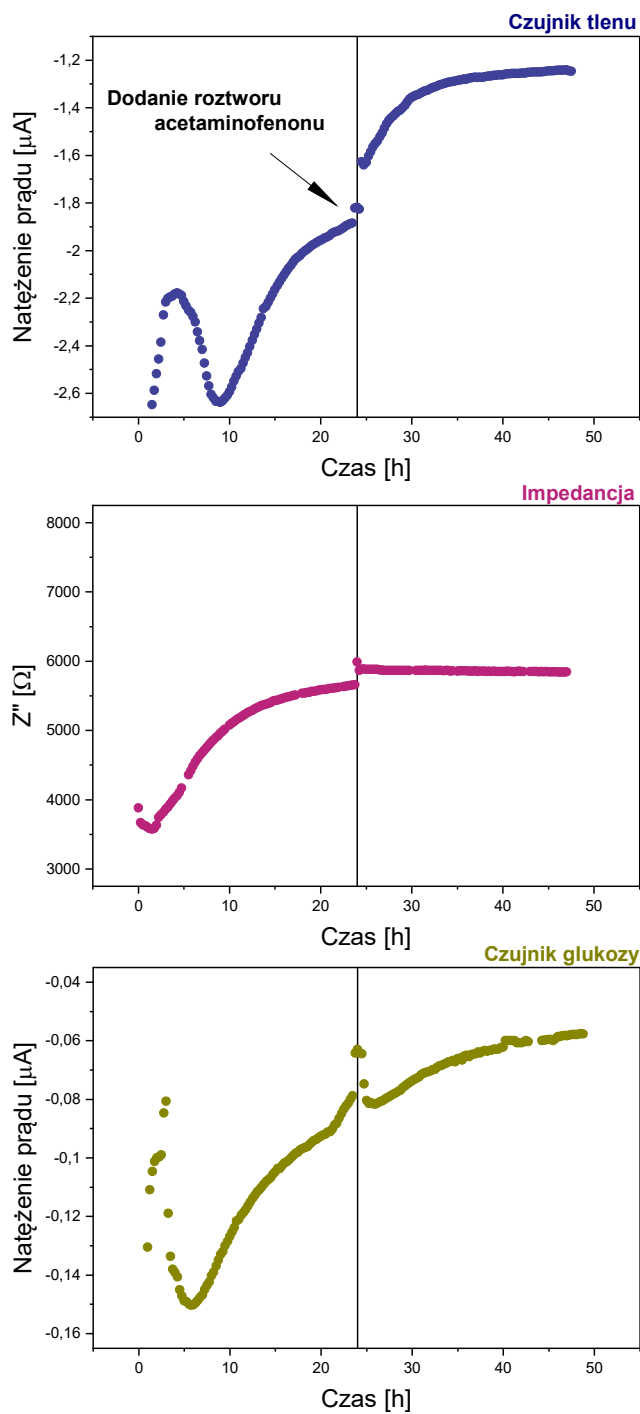
W przypadku czujnika do monitorowania adhezji komórkowej przez pierwsze 24h dla wszystkich stężeń obserwowano wzrost wartości impedancji świadczący o adhezji komórek na powierzchni elektrod. Po podaniu związku acetaminofenonu obserwowano różny sygnał w zależności od stężenia końcowego roztworu. Dla stężenia 1 mM obserwowano stabilizację wartości impedancji, dla 10 mM zaobserwowano skok impedancji, a następnie stabilizację sygnału, dla 50 mM obserwowano powolny spadek impedancji, świadczący o dysocjacji części komórek. W przypadku dwóch najwyższych stężeń obserwowano skok wartości impedancji (choć w przypadku 50 mM był on minimalny), który otrzymano również dla pomiaru kontrolnego – pomiar impedancji z roztworem acetaminofenonu bez obecności komórek (Rysunek 4.20.).

Jak zauważono w Rozdziale 4.4.1.3. otrzymane czujniki glukozy nie były bezpośrednią odpowiedzią związaną ze stężeniem glukozy, a ze zmieniającym się stężeniem tlenu. Jest to istotna wada czujników elektrochemicznych w stosunku do czujników optycznych, które nie ‘zużywają’ oznaczanej substancji. W przypadku tych czujników podobnie jak w przypadku czujników tlenu początkowo obserwowano logarytmiczny spadek wartości natężenia prądu, a następnie dla stężenia 1 mM stabilizację natężenia prądu, dla 10 mM ponowny wzrost, a dla 50 mM spadek poniżej wartości natężenia prądu przed zmianą pożywki.

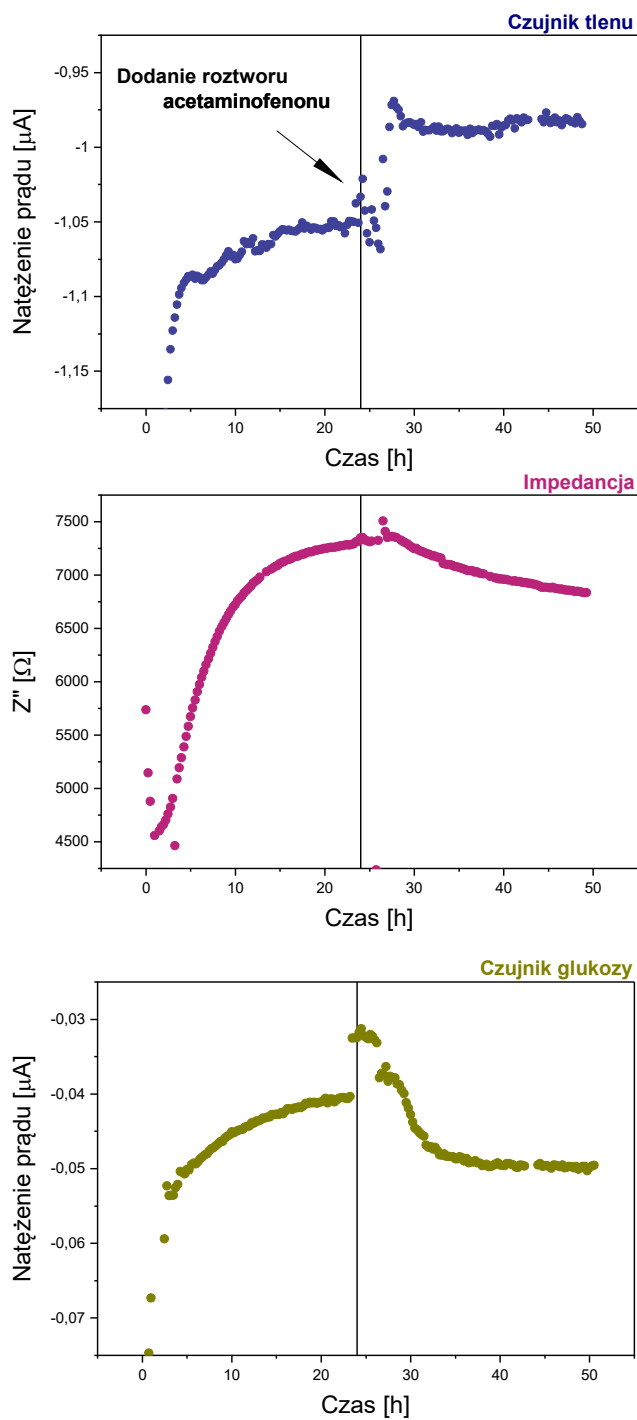
W przypadku powyższych pomiarów uzyskano powtarzalność sygnału pomiarów, jednak istotne jest aby w hodowli komórkowej umieścić, więcej niż jeden czujnik tego samego rodzaju. Powodem uzyskania niejednorodnego sygnału może być nierównomierna dystrybucja komórek w komorze hodowlanej i w pobliżu elektrod. W przypadku powyższych pomiarów wysianie komórek pod komorą laminarną i późniejsze umieszczenie elektrody odniesienia i przeciwelektrody pozwoliło na bardziej równomierne rozłożenie komórek w komorze i podobny sygnał, niż w przypadku pomiarów gdzie komórki były dodawane do komory hodowlanej w trakcie pomiaru (Rysunkach 4.8. oraz 4.11.).



Rysunek 4.21. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski), pomiarów EIS (kolor różowy) oraz pomiarów czujnika glukozy (kolor żółty) podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 1 mM.

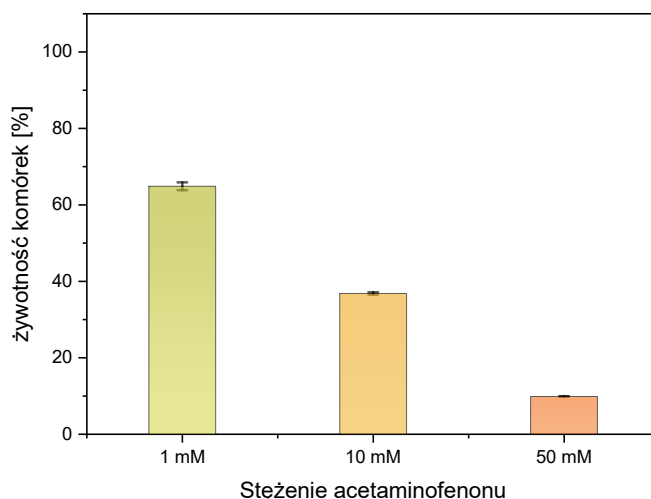


Rysunek 4.22. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski), pomiarów EIS (kolor różowy) oraz pomiarów czujnika glukozy (kolor żółty) podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 10 mM.



Rysunek 4.23. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski), pomiarów EIS (kolor różowy) oraz pomiarów czujnika glukozy (kolor żółty) podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 50 mM.

Zestawiając wyniki otrzymane w układzie pomiarowym (Rysunek 4.24.) z analizą przeprowadzoną z wykorzystaniem 96-dołkowej płytki, można ponownie zaobserwować trend związany z zahamowaniem proliferacji przy większym podawanym stężeniu. Zaobserwowano jednak znacząco obniżoną żywotność szczególnie dla stężenia 1 mM oraz 10 mM. Dla 1 mM uzyskano żywotność na poziomie 63%, natomiast dla 10 mM na poziomie 36%, podczas gdy na płytce 96-dołkowej stężenia te wyniosły odpowiednio 95% oraz 73%. Dla 50 mM uzyskano żywotność na poziomie 10% w badanym układzie.



Rysunek 4.24. Wpływ acetaminofenonu na żywotność komórek linii HepG2 w układzie pomiarowym w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.

Zaprezentowane wyniki uzyskane metodami elektrochemicznymi nie pozwalają na numeryczne określenie żywotności komórek na tym etapie badań, dlatego istotne są dodatkowe testy żywotności pozwalające na określenie końcowej wartości. Dodatkowa zewnętrzna kalibracja elektrod np. z wykorzystaniem metod optycznych na początku i na końcu pomiaru mogłaby pozwolić na dokładniejsze określenie stężenia tlenu podczas całego pomiaru. Wadą takiego rozwiązania jest otrzymanie dodatkowego sygnału w trakcie otwierania/zamykania drzwi od inkubatora czy poruszenia całym układem podczas umieszczania optody tlenowej w układzie.

4.5. Wnioski

Zaprezentowany szereg badań w niniejszym rozdziale potwierdza możliwości wykorzystanego układu w monitorowaniu hodowli komórkowych, takich jak zużycie tlenu oraz adhezja komórek do powierzchni. Analiza mikroskopowa oraz wyniki uzyskane za pomocą testu AlamarBlue potwierdzają zgodność wyników uzyskanych w układzie pomiarowym oraz na płytce 96-dołkowej. Niestety wyniki uzyskane metodami elektrochemicznymi nie pozwalają na numeryczne określenie żywotności komórek na tym etapie badań, dlatego istotne są dodatkowe testy żywotności pozwalające na określenie końcowej wartości. Dodatkową przewagą testów z wykorzystaniem metod optycznych na płytkach wielodołkowych jest możliwość wykonania wielu powtórzeń podczas jednego eksperymentu.

Opracowana macierz elektrodowa pozwoliła na uzyskanie podobnych sygnałów dla każdej elektrody, ale jak zauważono powtarzalność sygnału jest związana również z równomierną dystrybucją komórek w komorze hodowlanej. Zastanawiająca jest również obniżona żywotność komórek linii HepG2 w układzie, związana prawdopodobnie z właściwościami adhezyjnymi lub samym składem podstawy macierzy elektrodowej.

Prowadzenie pomiarów elektrochemicznych niestety nie pozwala na równoczesną analizę mikroskopową, bez przerywania samych pomiarów, co ma znaczący wpływ na rejestrowany sygnał. Ma to szczególnie wpływ na pomiary stężenia tlenu w hodowli, bowiem nawet jednorazowe otwarcie drzwi inkubatora, może zaburzyć równowagę stężenia tlenu. Powrót sygnału do wartości natężenia prądu przed wyjęciem układu z inkubatora trwał około 5h, co uniemożliwiało dokładność podczas krótkich pomiarów lub wydłużyłoby same pomiary poprzez oczekiwanie na powrót sygnału do wartości równowagowych.

Negatywnie natomiast oceniono opracowane biocujniki glukozy, które okazały się mało powtarzalne, nie tylko pomiędzy macierzami, ale również na jednej macierzy, do czego przyczynił się źle wybrany potencjał. Wykorzystanie oksydazy glukozowej w biocujnikach glukozy jest dość powszechne ze względu na wysoką specyficzność enzymu, a także na niskie koszty i stabilność czujników^[41]. Jednak pośrednicząca w reakcji cząsteczka tlenu dodatkowo wpływa na zmianę stężenia tlenu w komorze hodowlanej. W dalszej części projektu należałoby rozważyć biocujnik oparty o dehydrogezanę glukozy lub czujniki nieenzymatyczne, które nie wpływają tak znacząco na stężenie tlenu^[42]. Być może również wykorzystanie elektrod ITO/Au pozwoliłoby na opracowanie biocujników glukozy przy jednoczesnym wykorzystaniu elektrod złotych do monitorowanie stężenia tlenu.

Kolejnym aspektem zaprezentowanych badań jest wykorzystanie architektury proponowanego układu pomiarowego. Zaprojektowana komora hodowlana o średnicy 10 mm jest porównywalna z powierzchnią dołka znajdującego się na płytce 48-dołkowej, co w przypadku wielu powtórzeń zwiększa wykorzystanie pożywki hodowlanej i zawiesiny komórkowej potrzebnych do otrzymania istotnie porównywalnych wyników.

Otwarta architektura komory hodowlanej jednocześnie sprzyja podawaniu dodatkowych związków w celu badania ich wpływu na komórki bez zbędnego otwierania potencjalnej pokrywy oraz poruszania całym układem powodując dodatkowy sygnał podczas pomiaru. Z drugiej strony taki układ sprzyja wysokiemu parowaniu, powodując możliwe zateżnienie toksycznych substancji znajdujących się w pożywce hodowlanej, a także ułatwia przenoszenie się zakażeń.

Zastosowanie podstawy układu o niższej wysokości (5 mm) umożliwiłoby obserwacje mikroskopowe na podstawowym mikroskopie optycznym odwróconym, jednak wciąż sama konstrukcja układu nie pozwala na wykonanie zdjęć w większym przybliżeniu. Uniemożliwia również barwienie różnicowe i obserwacje mikroskopowe na mikroskopie konfokalnym.

4.6. Literatura

1. Zijl FV, Mikulits W. Hepatospheres: Three dimensional cell cultures resemble physiological conditions of the liver. *World J Hepatol.* 2010;2(1):1.
2. Calitz C, Hamman JH, Fey SJ, Wrzesinski K, Gouws C. Recent advances in three-dimensional cell culturing to assess liver function and dysfunction: from a drug biotransformation and toxicity perspective. *Toxicol Mech Methods.* 2018;28(5):369-385.
3. Murray R K. Metabolizm ksenobiotyków. In: *Biochemia Harpera*. IV. PZWL; 938-946.
4. Kammerer S. Three-Dimensional Liver Culture Systems to Maintain Primary Hepatic Properties for Toxicological Analysis In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10214.
5. Yao T, Zhang Y, Lv M, Zang G, Ng SS, Chen X. Advances in 3D cell culture for liver preclinical studies. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2021;53(6):643-651.
6. Patricio Godoy et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013;87(8):1315-1530.
7. Hussein KH, Park KM, Ghim JH, Yang SR, Woo HM. Three dimensional culture of HepG2 liver cells on a rat decellularized liver matrix for pharmacological studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016;104(2):263-273.
8. Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to

- inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol.* 2012;28(2):69-87.
9. Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line HepG2 with Regard to Their Biotransformation Properties. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(8):1035-1042.
 10. Busso N, Chesne C, Delers F, Morel F, Guillouzo A. Transforming growth-factor- β (TGF- β) inhibits albumin synthesis in normal human hepatocytes and in hepatoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;171(2):647-654.
 11. Meier M, Klein HH, Kramer J, Drenckhan M, Schütt M. Calpain inhibition impairs glycogen syntheses in HepG2 hepatoma cells without altering insulin signaling. *J Endocrinol.* 2007;193(1):45-51.
 12. Sainz B, TenCate V, Uprichard SL. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virology.* 2009;6(1):103.
 13. Andersson TB, Kanebratt KP, Kenna JG. The HepaRG cell line: a unique *in vitro* tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012;8(7):909-920.
 14. Gomez-Lechon M, Donato M, Castell J, Jover R. Human Hepatocytes in Primary Culture: The Choice to Investigate Drug Metabolism in Man. *Curr Drug Metab.* 2004;5(5):443-462.
 15. Xu JJ, Diaz D, O'Brien PJ. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem Biol Interact.* 2004;150(1):115-128.
 16. Hynes J, Hill R, Papkovsky DB. The use of a fluorescence-based oxygen uptake assay in the analysis of cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2006;20(5):785-792.
 17. Alberts B et al. W jaki sposób komórki uzyskują energię z pożywienia. In: *Podstawy Biologii Komórki*. Vol II. PWN; 2009:427-453.
 18. Ast T, Mootha VK. Oxygen and mammalian cell culture: are we repeating the experiment of Dr. Ox? *Nat Metab.* 2019;1(9):858-860.
 19. Weltin A, Slotwinski K, Kieninger J, et al. Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. *Lab Chip.* 2014;14(1):138-146.
 20. Dornhof J, Kieninger J, Rupitsch SJ, Weltin A. Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip (2019–2024). *Lab Chip.* 2025;25(5):1149-1168.
 21. Tomecka E, Tokarska K, Jastrzębska E, Chudy M, Brzózka Z. Inżynieria komórkowa w systemach Lab-on-a-chip *Wiadomości chemiczne.* 2015;(69):9-10.
 22. Campbell SB, Wu Q, Yazbeck J, Liu C, Okhovatian S, Radisic M. Beyond Polydimethylsiloxane: Alternative Materials for Fabrication of Organ-on-a-Chip Devices and Microphysiological Systems. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021;7(7):2880-2899.
 23. Amy Leson. *Design and Assesment of a Microfluidic Nanomaterial-Based Biosensing Platform*. Praca magisterska. Hamburg University of Applied Sciences; 2018.

24. Kappalakandy Valapil K, Filipiak MS, Rekiel W, et al. Fabrication of ITO microelectrodes and electrode arrays using a low-cost CO₂ laser plotter. *Lab Chip*. 2023;23(17):3802-3810.
25. Kieninger J, Weltin A, Flamm H, Urban GA. Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip. *Lab Chip*. 2018;18(9):1274-1291.
26. General Method for Measuring Cytotoxicity or Proliferation Using alamarBlue. <https://www.bio-rad-antibodies.com/measuring-cytotoxicity-proliferation-spectrophotometry-fluorescence-alamarblue.html>
27. Probst H, Schiffer H, Gekeler V, et al. Oxygen Dependent Regulation of DNA Synthesis and Growth of Ehrlich Ascites Tumor Cells in Vitro and in Vivo.
28. Kieninger J, Aravindalochanan K, Sandvik JA, Pettersen EO, Urban GA. Pericellular oxygen monitoring with integrated sensor chips for reproducible cell culture experiments. *Cell Prolif*. 2014;47(2):180-188.
29. Valapil- Kappalakandy K. *ITO Microelectrodes and Microelectrode Arrays for the Analysis of Cell Cultures and Biomedical Applications*. Praca Doktorska. Instytut Chemii Fizycznej PAN; 2024.
30. Busche M, Rabl D, Fischer J, et al. Continuous, non-invasive monitoring of oxygen consumption in a parallelized microfluidic in vitro system provides novel insight into the response to nutrients and drugs of primary human hepatocytes. *EXCLI J 21Doc144 ISSN 1611-2156*. Published online 2022.
31. Langdon SP. *Cancer Cell Culture*. Vol 88. Humana Press; 2003.
32. Johnson RH, Einstein HE. Amphotericin B and Coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1111(1):434-441.
33. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*. 2009;26(4):223-227.
34. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*. 2014;28(3):1317-1330.
35. Wnuk D. Podstawy krioprezewacji komórek. *Postępy Biochem*. Published online October 28, 2022.
36. Nguyen ST, Nguyen HTL, Truong KD. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed Res Ther*. 2020;7(7):3855-3859.
37. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2003;31(12):1499-1506.
38. Lőrincz T, Deák V, Makk-Merczel K, Varga D, Hajdinák P, Szarka A. The Performance of HepG2 and HepaRG Systems through the Glass of Acetaminophen-Induced Toxicity. *Life*. 2021;11(8):856.
39. Heichler C, Nagy M, Wolf P. Evaluation of hepatotoxic effects of acetaminophen on HepG2 cells by parallel real-time monitoring in a multi-sensor analysis platform for automated cell-based assays. Published online 2022.
40. Prill S, Bavli D, Levy G, et al. Real-time monitoring of oxygen uptake in hepatic bioreactor shows CYP450-independent mitochondrial toxicity of acetaminophen and amiodarone. *Arch Toxicol*. 2016;90(5):1181-1191.

41. Chen C, Xie Q, Yang D, et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *RSC Adv.* 2013;3(14):4473.
42. Saleh FS, Mao L, Ohsaka T. Development of a dehydrogenase-based glucose anode using a molecular assembly composed of nile blue and functionalized SWCNTs and its applications to a glucose sensor and glucose/O₂ biofuel cell. *Sens Actuators B Chem.* 2011;152(1):130-135.

5. Ocena możliwości wykorzystania opracowanej macierzy elektrodowej do monitorowania trójwymiarowych hodowli komórkowych

5.1. Wprowadzenie

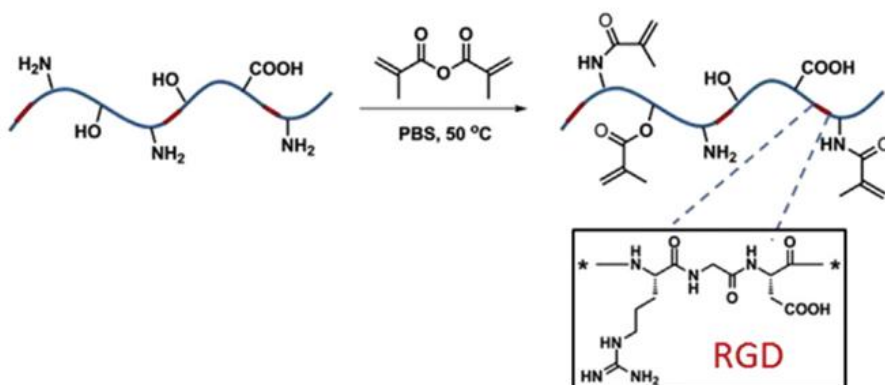
Postęp technologiczny w dziedzinie biomateriałów pozwala na wprowadzenie różnorodnych układów do hodowli komórkowych, umożliwiając kontrolowanie sygnałów mechanicznych, kompozycyjnych i strukturalnych, a tym samym dokładniejsze odwzorowywanie warunków *in vivo*^[1]. Szczególnie wyróżniają się rusztowania hydrożelowe, które naśladują istotne elementy macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM)^[2], a ich właściwości mechaniczne są podobne do właściwości tkanek miękkich. Ponadto wspomagają adhezję komórek oraz umożliwiają dyfuzję tlenu oraz składników odżywczych^[3]. Istotną cechą jest ich transparentność, która umożliwia obrazowanie komórek.

Można wyróżnić zarówno hydrożele pochodzenia naturalnego takie jak kolagen, fibrynogen czy alginiany, jak i hydrożele syntetyczne na bazie polietylenoglikolu (PEG) czy poliakryloamidu (PA). Często w hydrożelach stosowane są materiały półsyntetyczne (hybrydowe), kwas hialuronowy, polipeptydy lub żelatyna metakryloilowa (GelMa). Hydrożele pochodzenia naturalnego zapewniają obecność adhezyjnych ligandów, a także sygnałów endogennych, które sprzyjają interakcjom międzykomórkowym. Jednak ich złożoność oraz zmienność utrudniają zrozumienie procesów proliferacji, różnicowania i migracji badanych komórek^[4].

W ostatnich latach pojawiło się szczególne zainteresowanie wykorzystaniem GelMa. Jego dużą zaletą jest możliwość kontrolowania właściwości mechanicznych poprzez zmianę stężenia, stopnia funkcjonalizacji (DoF, ang. *degree of functionalization*), rodzaju zastosowanego fotoinicjatora oraz czasu ekspozycji na promieniowanie UV^[5]. GelMA, podobnie jak żelatyna, posiada sekwencje bioaktywne (np. arginina-glicyna-kwas asparaginowy) odpowiedzialne za adhezję komórek oraz miejsca cząsteczki odpowiedzialne za degradację komórkową^[6,7].

GelMA wyróżnia się doskonałą biokompatybilnością, degradowalnością i niskim kosztem produkcji. Synteza hydrożelu opiera się na bezpośredniej reakcji żelatyny z bezwodnikiem metakrylowym (MA ang. *methacrylic anhydride*) w buforze fosforanowym o pH 7,4 w temperaturze 50°C. Prowadzi to do podstawienia metakryloilowego do reaktywnych grup aminowych i hydroksylowych reszt aminokwasowych (Rysunek 5.1.)^[5]. Ilość dodawanego MA warunkuje stopień podstawienia metakryloilowego, co ma wpływ m.in. na moduł sprężystości hydrożelu^[5]. Proces sieciowania GelMa pod wpływem ekspozycji na promieniowanie UV, z użyciem fotoinicjatorów takich jak 2-hydroksy-1-[4-(2-

hydroksyetykso)fenylo] -2-metylo-1-propanon (Irgacure 2959)^[8,9] oraz sól fosfinianu acylu litu (LAP)^[10].



Rysunek 5.1. Reakcja żelatyny i bezwodnika metakrylowego w celu substytucji grup podstawowych metakryloilowych. Modyfikacja zachodzi w grupach aminowych i hydroksylowych^[11].

Rusztowania hydrożelowe GelMa są szeroko stosowane w trójwymiarowych hodowlach komórkowych. Komórki zawieszone w GelMa wykazują wysoką żywotność (>80%).

Badania zaprezentowane w niniejszym rozdziale zostały wykonane podczas stażu w Niemczech na Uniwersytecie Leibniza w Hanowerze (*Leibniz Universität Hannover*) w grupie dr Antoniny Lavrentiev w Instytucie Chemii Technicznej.

5.2. Materiały i metody

5.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

- Inkubator do hodowli linii komórkowych z podłączeniem CO₂ (ThermoFisher),
- Inkubator do hodowli linii komórkowych C16 (Labotect Labor Technik-Göttingen GmbH),
- Komora laminarna (ThermoFisher),
- Mikroskop odwrócony fluorescencyjny z kontrastem fazowym (Olympus),
- Czytnik płytek wielodołkowych Fluoroskan Acent (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA),

- Urządzenie do obrazowania komórek - Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius),
- Cytation™ 5 Imaging Multi - Mode Reader (BioTek Instruments),
- Optical O₂ Measurement System (ibidi OPAL),
- Waga analityczna (Mettler Toledo),
- Wirówko-worteks (MiniSpin Eppendorf AG),
- Napylarka (Leica EM MED020),
- Crosslinker UV (SUNLU Biolinker).

5.2.2. Materiały

- CPOx-mikroczuJNIKI tlenu, pomarańczowe (ibidi),
- Filtry PES (Sigma -Aldrich),
- Podłoże BORO FLOAT® 33 (SCHOTT),
- Target do napylania złota (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Target do napylania chromu (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Target do napylania tytanu (Mennica Metale Sp. z o.o.),
- Probówki typu eppendorf (Sarstedt),
- Końcówki do pipet (VWR),
- Probówki typu Falcon 15 ml (Sarstedt),
- Probówki typu Falcon 50 ml (Sarstedt),
- Pipety serologiczne (Sarstedt),
- Komora Bürkera (Sigma -Aldrich),
- Butelki do hodowli komórkowej (Sarstedt),
- Płytki 96-dołkowe, 48-dołkowe oraz 6-dołkowe (Greiner Bio-One, CELLSTARR).

5.2.3. Odczynniki

Acetaminofenon (Sigma-Aldrich), tabletki PBS pH 7,4 (Sigma-Aldrich), chlorek potasu (Sigma-Aldrich); hydroxymetylferrocene (abcr).

Wykorzystane odczynniki charakteryzowały się czystością analityczną i były przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta. Do sporządzania wodnych roztworów wzorcowych oraz buforowych wykorzystywano wodę demineralizowaną z systemu Sartorius Arium Comfort I, o rezystancji równej 18,2 MΩ·cm.

5.3. Metody badań

5.3.1. Pomiary elektrochemiczne

Pomiary elektrochemiczne przeprowadzono za pomocą potencjostatu oraz PalmSens 4 kontrolowanego przez oprogramowanie PSTrace (wersja 5.8 oraz 5.9). Pomiary wykonano w układzie trójelektrodowym składającym się z wybranej elektrody pracującej, elektrody odniesienia Ag/AgCl (1 M KCl) (IJ Cambria Scientific Ltd.) o średnicy 2 mm oraz drutu platynowego o średnicy 0,5 mm (Mennica Metale Sp. z o.o.) jako elektrody pomocniczej.

Pomiary prowadzono w inkubatorze do hodowli komórkowych z doprowadzeniem CO₂ oraz N₂ C16 (Labotect Labor Technik-Göttingen GmbH).

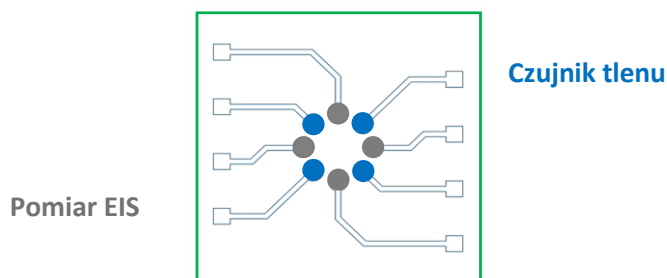
5.3.2. Układ pomiarowy

W badaniach wykorzystano układ pomiarowy opisany w Rozdziale 4.3.2.

5.3.3. Przygotowanie elektrod

Do badań przedstawionych w niniejszym rozdziale wykorzystano elektrody złote o średnicy 1,75 mm za wykonane za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni. Proces napyłania przeprowadzono podobnie jak w Rozdziale 2.3.3.

Na macierzy elektrod wykorzystano cztery elektrody pomiaru oznaczania tlenu oraz cztery elektrody do pomiaru elektrochemicznej impedancji spektroskopowej (EIS) – Rysunek 5.2.



Rysunek 5.2. Schematyczne przedstawienie macierzy czujnikowej wykorzystanej w niniejszym rozdziale.

- **Pomiar oznaczania stężenia tlenu**

Monitorowanie tlenu opiera się o amperometryczną redukcję rozpuszczonego tlenu w pożywce hodowlanej na elektrodzie złotej przy potencjale -0,6 V.

Ze względu na możliwość zakażenia w hodowli komórkowej, pomiar redukcji tlenu prowadzono bez dodatkowej modyfikacji elektrod złotych. Pozwoliło to na dokładniejszą sterylizację elektrod tuż przed wysiewem komórek do układu.

- **Pomiar EIS**

Badania przeprowadzano przy napięciu 0,2 V, w zakresie częstotliwości od 50 do 150 Hz.

5.3.4. Przygotowanie układu do badań

Przed rozpoczęciem hodowli komórkowej układ poddano procesowi sterylizacji. W tym celu każdy element oraz wykorzystywaną elektrodę przemyto 70% roztworem etanolu, a następnie układ poddano działaniu promieniowania ultrafioletowego (lampa UV-C) – Purion UVC Box, przez 10 min o mocy 2400 J/m².

5.3.5. Hodowla komórkowa

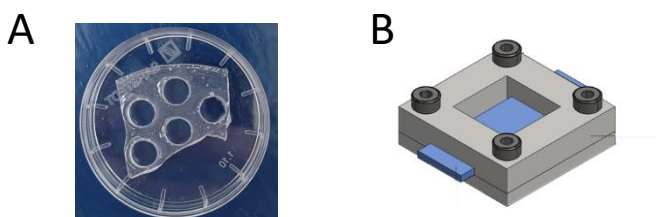
W pracy wykorzystano dwie linie komórkowe. W pierwszej części prowadzono badania z wykorzystaniem ludzkich komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (hAD-MSC ang. *human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*) zróżnicowane w chondrocyty (huCho-HRE3) zakupione od Engineered Cells for Science and Pharma. Komórki hodowano jako standardową monowarstwę w pożywce huChon (Inscreen) wzbogaconej 10% surowicą ludzką (CCpro), 6% suplement huCho (Inscreen) oraz 0,5% gentamycynę (Sigma). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂). Po osiągnięciu przez komórki konfluencji na poziomie 80-90%, przeprowadzano procedurę pasażu. Do odklejenia komórek od powierzchni używano roztworu akutazy (Sigma-Aldrich).

W drugiej części pracy wykorzystano ludzką linię komórkową raka wątroby – HepG2 z ATCC. Komórki hodowano jako standardową monowarstwę w pożywce DMEM o wysokiej zawartości glukozy (Sigma-Aldrich), wzbogaconej o 10% FBS (Gibco), oraz streptomycynę [10 000 U ml⁻¹], penicylinę [10 mg ml⁻¹] 1% v/v (Sigma-Aldrich) oraz amfoterycynę B [250 ug/ml] 1% v/v (PPA laboratories). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂). Po osiągnięciu przez komórki

konfluencji na poziomie 80-90%, przeprowadzano procedurę pasażu. Do odklejenia komórek od powierzchni używano 0,25% roztworu Trypsyna/EDTA (Sigma-Aldrich).

5.3.6. Przygotowanie matrycy hydrożelowej

W badaniu wykorzystano hydrożel GelMa A5 o podanych właściwościach (Tabela 5.1.), którą zsyntezowano w dniu 28 czerwca 2021 r. zgodnie z metodą opracowaną przez Shirahama and Lee^[12]. Przygotowanie hydrożelu GelMa wykonywano na podstawie procedury opracowanej przez A.G. Lavrentievą^[13]. W badaniach wstępnych użyto silikonowych form do utworzenia trójwymiarowych hodowli komórkowych oraz kwadratowych wytworzonych metodą druku 3D (Rysunek 5.3.). Formy kwadratowe były przyklejone do powierzchni dołka na płytce 6-dołkowej, natomiast silikonowe formy pozwalały na wyjęcie struktury i hodowlę na płytce.



Rysunek 5.3. Schematyczne przedstawienie form do utworzenia trójwymiarowych hodowli komórkowych: okrągłe formy silikonowe o średnicy 6 mm (A) oraz kwadratowych wytworzonych metodą druku 3D (B).

Roztwór hydrożelu GelMA przygotowano poprzez odważenie odpowiedniej ilości GelMA i rozpuszczenie go w roztworze buforowym soli fizjologicznej (PBS, pH 7,4). Roztwór GelMA inkubowano w łaźni wodnej aż do całkowitego rozpuszczenia fragmentów GelMA w temperaturze 37°C. Ogrzany roztwór był sterylizowany przy użyciu filtra z polieterosulfonu (PES) 0,45 µm (średnica 10 mm).

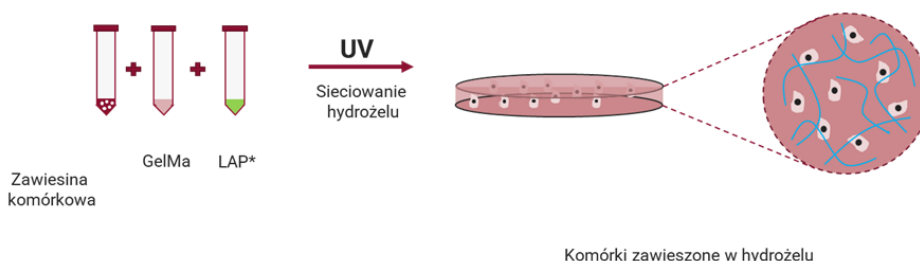
Tabela 5.1. Właściwości wybranego hydrożelu GelMa A5

Data przygotowania	DoF TNBS	DoF Ninhydrin	Współczynnik pęcznienia	Moduł ścinania
28.06.2021	30.5%, 28.1%	20.1%	19,4	5% w/v 2,7 Pa , 6% w/v 16,3 Pa, 6,5% 23,4 Pa, 7% 98,3 Pa, 8% w/v 148,8 Pa

5.3.7. Hodowla komórek na rusztowaniach hydrożelowych

Hodowlę komórek w warunkach statycznych na rusztowaniach hydrożelowych przeprowadzano na płytkach 24-dołkowych do pomiarów wstępnych oraz w zaprojektowanym układzie do pomiarów elektrochemicznych (Rysunek 4.3.).

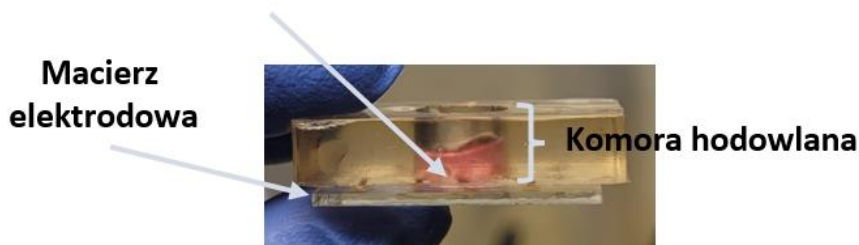
W celu enkapsulacji komórek w hydrożelu (Rysunek 5.4.), przeprowadzono etap pasażu komórek, a następnie określano gęstość zawiesiny komórkowej za pomocą komory Bürkera. Zawiesinę komórkową o gęstości komórek 10^6 komórek/ml zawieszano w odpowiedniej ilości przygotowanego hydrożelu (rozdział 5.3.6.) i umieszczano w silikonowych cylindrycznych formach (o średnicy 6 mm) lub bezpośrednio na elektrodach w układzie. Jako fotoinicjator wykorzystano fenyl-2,4,6-trimetylobenzoilofosfinian litu (LAP). Do procesu sieciowania wykorzystano promieniowanie UV o intensywności $1,2 \text{ J/cm}^2$. Otrzymane konstrukty hydrożelowe inkubowano na 24-dołkowych płytkach w 1000 μl pożywki DMEM o wysokiej zawartości glukozy, wzbogaconej o FBS, oraz streptomycynę [$10\,000 \text{ U ml}^{-1}$], penicylinę [10 mg ml^{-1}] 1% v/v oraz amfoterycynę B [$250 \mu\text{g/ml}$]. Pożywkę komórkową zmieniano co 3 dni w przypadku dłuższej hodowli.



Rysunek 5.4. Schemat przygotowania enkapsulacji zawiesiny komórkowej w matrycy hydrożelowej GelMa.

W badaniach wpływu acetaminofenonu metodą elektrochemiczną, 200 μl przygotowanej zawiesiny komórkowej zmieszanej z hydrożelem, umieszczano bezpośrednio na podłożu z elektrodami (Rysunek 5.5). Po usieciowaniu, montowano cały układ, a następnie komórki inkubowano przez 48h w 700 μl pożywki DMEM o wysokiej zawartości glukozy wzbogaconej o FBS, oraz streptomycynę [$10\,000 \text{ U ml}^{-1}$], penicylinę [10 mg ml^{-1}] 1% v/v oraz amfoterycynę B [$250 \mu\text{g/ml}$].

Komórki zawieszone w hydrożelu



Rysunek 5.5. Zdjęcie komory hodowlanej po usieciowaniu matrycy hydrożelowej na macierzy elektrodowej po dodaniu 200 μ l pożywki hodowlanej.

5.3.8. Metody oceny proliferacji i żywotności komórek

- Test Proliferacji CTB

W celu określenia żywych/martwych komórek, komórki inkubowano w 10% roztworze z odczynnikami CTB (Promega) w pożywce DMEM, przez 4h w temperaturze 37°C, następnie analizowano za pomocą wielofunkcyjnego czytnika płytek Fluoroskan Acent (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA) przy długości fali wzbudzenia 544 nm i długości fali emisji 590 nm. Gęstość zawiesiny komórkowej określono za pomocą komory Bürkera. Dodatkowo przeprowadzano kontrolę negatywną (komórki z 1% Triton-X 100 (Thermo Fisher)) oraz pozytywną (komórki nie traktowane związkiem).

- Barwienie różnicowe komórek

W celu obrazowania żywych/martwych komórek, hodowlę komórkową na matrycy hydrożelowej inkubowano w 3 μ l roztworze Calcein-AM (Merck) i 2,5 μ l roztworu jodku propidyny (Merck) w pożywce DMEM, przez 30 minut w temperaturze 37°C, następnie analizowano za pomocą wielofunkcyjnego czytnika płytek Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader.

5.4. Wyniki i dyskusja

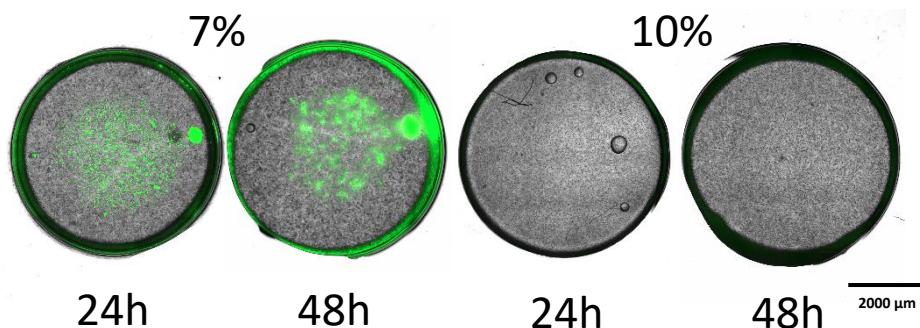
Celem badań zaprezentowanych w niniejszym rozdziale była ocena opracowanej macierzy elektrodowej oraz wykorzystanego układu pomiarowego w pomiarze parametrów metabolicznych w szczególności analizy stężenia tlenu w trójwymiarowych hodowlach komórkowych na rusztowaniach hydrożelowych. Dodatkowo porównano działanie czujników optycznych i elektrochemicznych.

5.4.1. Wykorzystanie czujników optycznych w pomiarach stężenia tlenu w trójwymiarowych hodowlach komórkowych

W pierwszym etapie pracy oceniono możliwość wykorzystania czujników optycznych tlenu na przykładzie kulek tlenowych (ang. *oxygen beads*) w trójwymiarowych hodowlach komórkowych. W badaniu wykorzystano hAD-MSC zróżnicowane w chondrocyty (huCho). Reporterowe komórki (ang. *hipoxia-reported cells*) zawierały element czujnikowy HRE-dUnaG stabilnie zintegrowany z genomem hAD-MSC poprzez transdukcję lentiwirusową^[14]. W warunkach niedotlenienia następuje stabilizacja czynnika HIF-1 α , która aktywuje ekspresję fluorescencyjnego białka UnaG^[15,16], pozwalająca na obserwację początku procesu niedotlenienia komórek. Proces ten jest niezależny od obecności tlenu cząsteczkowego.

W celu określenia odpowiedniego stężenia GelMa oraz gęstości zawiesiny komórkowej, aby w ciągu kilku dni można było zaobserwować efekt świecenia komórek (fluorescencji) przeprowadzono krótkie porównanie wybranych dwóch stężeń hydrożelu GelMa - 7% oraz 10%, a następnie porównano dwie różne gęstości zawiesiny komórkowej - 4×10^6 komórek/ml oraz 3×10^6 komórek/ml. Testy prowadzono z wykorzystaniem 24-dołkowych oraz 6-dołkowych płytek.

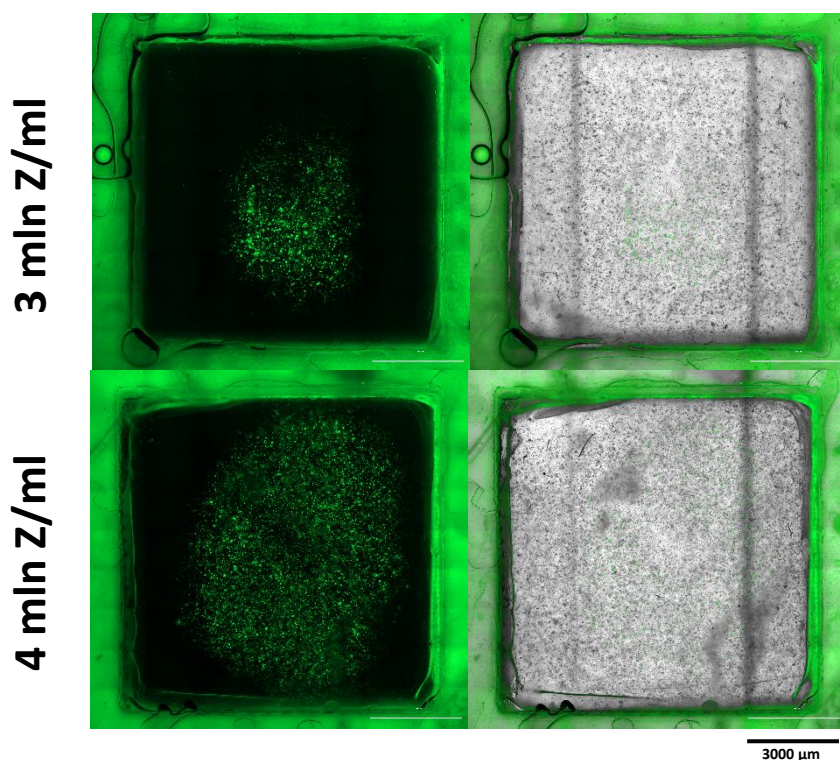
W pierwszym etapie enkapsulowano zawiesinę komórkową o gęstości $2,5 \times 10^6$ komórek/ml w 7% oraz 10% hydrożelu GelMa w silikonowej formie o średnicy 6 mm (Rysunek 5.3.). Analizę mikroskopową prowadzono po 24h oraz 48h inkubacji w standardowych warunkach hodowlanych. Zdjęcia przedstawiono na Rysunku 5.6. Zaobserwowano, że w przypadku matrycy hydrożelowej o stężeniu 7%, widoczna jest fluorescencja komórek już po 24h, natomiast w przypadku matrycy o stężeniu 10% nie zaobserwowano fluorescencji w ciągu 48h hodowli. Silny sygnał niedotlenienia jest obserwowany głównie w centrum struktur hydrożelowych, prawdopodobnie ze względu na najsilniejsze ograniczenia dyfuzji tlenu. Zauważono zwiększenie intensywności fluorescencji wraz ze zmniejszeniem stężenia matrycy hydrożelowej^[13]. Fluorescencyjna ramka wokół każdego hydrożelu wynika z załamania światła podczas analizy mikroskopowej.



Rysunek 5.6. Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ różnego stężenia matrycy hydrożelowej GelMa (7% oraz 10%) na aktywację genów reporterowych w badanych komórkach linii huCho, która nastąpiła w wyniku ograniczonej dyfuzji i metabolicznego zużycia tlenu po 24h i 48h inkubacji w pożywce hodowlanej. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi Z. Skala 2000 μm.

W drugim etapie enkapsulowano zawiesinę komórkową o gęstości 3×10^6 komórek/ml oraz 4×10^6 komórek/ml w 7% hydrożelu GelMa w kwadratowej formie o długości boku 10 mm (Rysunek 5.3.). Dodatkowo hodowla została przykryta szkiełkiem o szerokości 6 mm. Analizę mikroskopową prowadzono po 24h, 48h oraz 72h inkubacji w standardowych warunkach hodowlanych.

W trakcie inkubacji dla obu hodowli obserwowano rozprzestrzenianie się komórek w hydrożelu dopiero po 48h inkubacji w pożywce komórkowej. Natomiast dopiero po 72h zaobserwowano świecenie komórek. Hodowla z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 3×10^6 komórek/ml charakteryzowała się mniejszą ilością komórek wykazujących fluorescencję, a co za tym idzie większym stężeniem tlenu w rusztowaniach hydrożelowych. Dla gęstości komórek 4×10^6 komórek/ml obserwowano fluorescencję komórek w prawie całej objętości hodowli, co świadczyło o silniejszym niedotlenieniu badanej populacji. Dlatego w następnym eksperymencie wykorzystano hydrożel o mniejszym stężeniu. Obserwacje mikroskopowe przedstawiono na Rysunku 5.7.

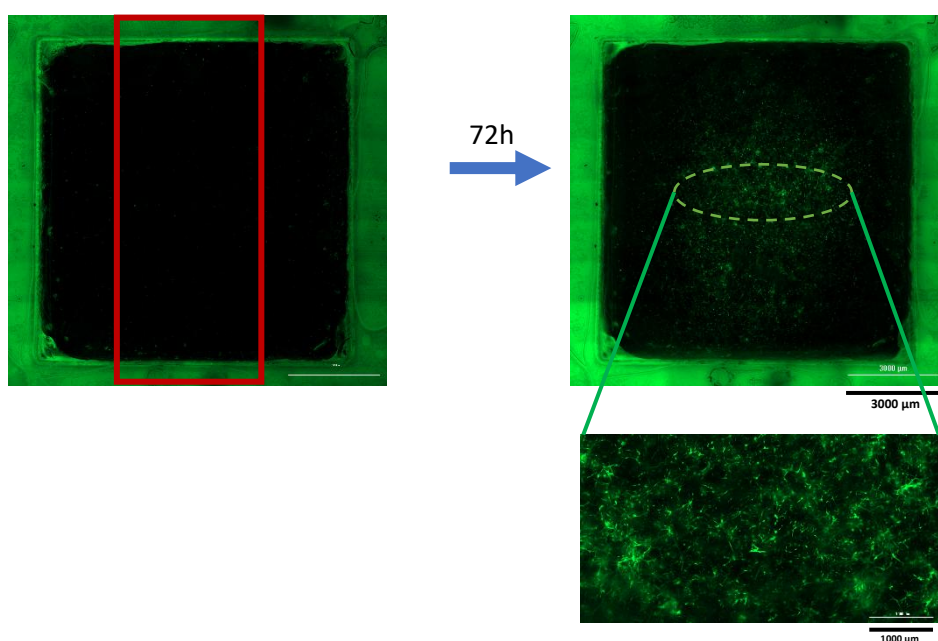


Rysunek 5.7. Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ gęstości zawiesiny komórkowej (3×10^6 komórek/ml oraz 4×10^6 komórek/ml) na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 7% na aktywację genów reporterowych, w wyniku ograniczonej dyfuzji i metabolicznego zużycia tlenu, w komórkach linii huCho po 72h inkubacji w pożywce hodowlanej. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi-Z. Skala 3000 μm .

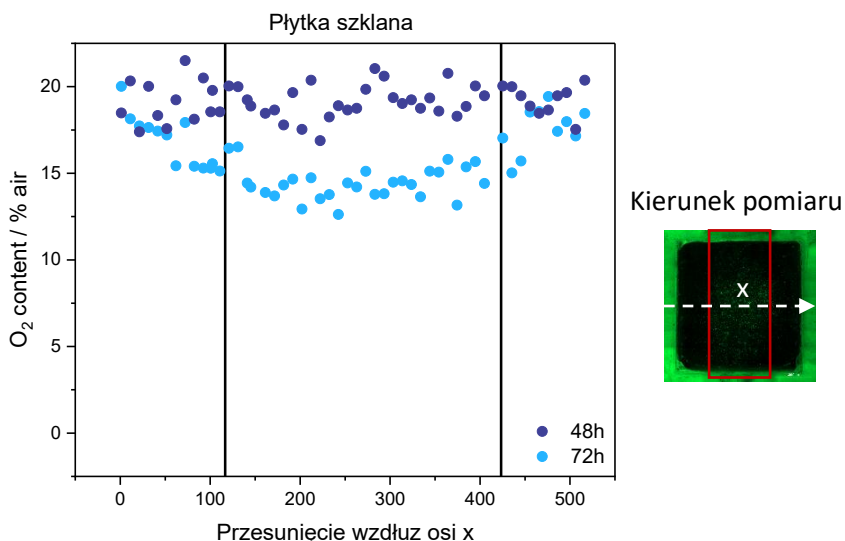
W kolejnym etapie enkapsulowano zawiesinę komórkową o gęstości 4×10^6 komórek/ml 6,5% hydrożelu GelMa wraz mikroczytnikami tlenu w formie kulek. Podobnie wykorzystano kwadratową formę do utworzenia kształtu hodowli, którą przykryto szkiełkiem o szerokości 6 mm. Analizę mikroskopową prowadzono po 24h, 48h oraz 72h inkubacji w standardowych warunkach hodowlanych.

Podobnie po 48h inkubacji zaobserwowano rozprzestrzenianie się komórek w hydrożelu, a po 72h zaobserwowano fluorescencję komórek. Równocześnie po 48h i 72h przeprowadzono analizę zawartości tlenu z wykorzystaniem zawieszonych w hodowli mikroczytników tlenu. Jako 21% przyjęto zawartość tlenu mierzoną po 24h inkubacji samych mikroczytników tlenu w hydrożelu o stężeniu 6,5%. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 5.8.-5.9.

Na zdjęciach można zaobserwować komórki, które pod wpływem obniżonego stężenia tlenu zaczynają wykazywać fluorescencję. Przede wszystkim są one położone w centralnej części układu, gdzie było umiejscowione dodatkowo szkiełko, które sztucznie wytworzyło warunki niedotlenienia. Analiza stężenia tlenu otrzymana z wykorzystaniem mikroczuźników tlenu zanurzonych w rusztowaniach hydrożelowych (Rysunek 5.9.) również wskazywała obniżoną zawartość tlenu w centralnej części hodowli w stosunku do jej brzegów. Obecne zastosowanie optycznych czuźników tlenu umożliwia pomiar stężenia tlenu w całej objętości hodowli. Natomiast jego wadą jest konieczność umieszczenia całego układu pod odpowiednim mikroskopem fluorescencyjnym, co powoduje zmianę temperatury hodowli i może mieć wpływ szczególnie na wrażliwe komórki.



Rysunek 5.8. Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające uzyskany gradient stężeń tlenu poprzez dodatkowe szkiełko mikroskopowe o szerokości 6 mm w hodowli 3D w komórek linii huCh_o z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 4×10^6 komórek/ml na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 6,5% po 72h inkubacji w pożywce hodowlanej. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi-Z. Skala 3000 μm .

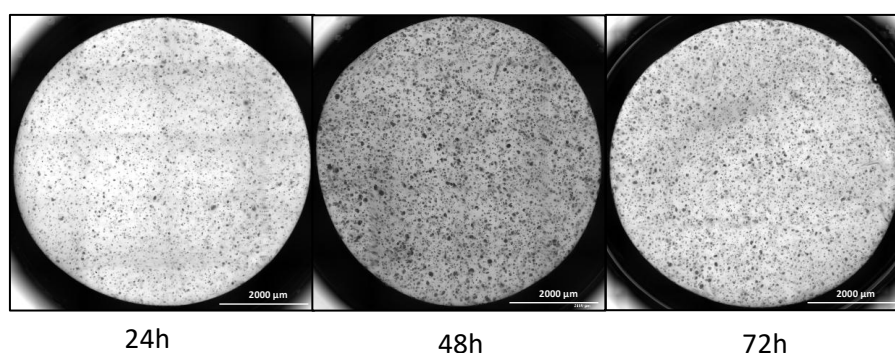


Rysunek 5.9. Odpowiedź czujników tlenowych zawieszonych w trójwymiarowej hodowli komórek linii huCho na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 6,5% po 48h oraz 72h inkubacji w pożywce hodowlanej. Pomiar prowadzony z wykorzystaniem mikroczytników tlenu (ibidi OPAL – Optical O₂ Measurement System).

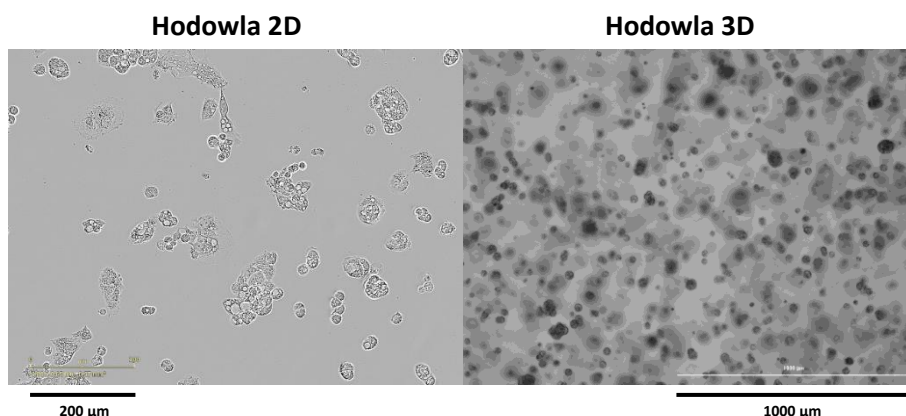
5.4.2. Ocena proliferacji komórek HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa

W kolejnym etapie badań określano możliwość hodowli komórek linii HepG2 w hodowli 3D z wykorzystaniem rusztowań hydrożelowych GelMa. Na początku określono szybkość wzrostu komórek HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa. Hodowlę 3D uzyskano na drodze enkapsulacji zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^6 komórek/ml w 10% hydrożelu GelMa. Ocenę proliferacji przeprowadzano w każdym kolejnym dniu hodowli przez 3 dni. Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano zwiększenie proliferacji poprzez kolejne dni hodowli na matrycy hydrożelowej, co szczególnie widoczne jest po 72h hodowli (Rysunek 5.10.). Na zdjęciach konstruktów hydrożelowych można również zaobserwować równomierne rozłożenie komórek w przestrzeni. Komórki przyjęły okrągły kształt, w przeciwieństwie do podłużnego, płaskiego kształtu w przypadku hodowli 2D, a także do komórek linii huCho obserwowanych w Rozdziale 5.4.1. Zaobserwowano również brak większych agregatów komórkowych przez pierwsze trzy dni hodowli w matrycy hydrożelowej, co jest zauważalne w przypadku hodowli 2D (Rysunek 5.11.). W przypadku pozostawienia hodowli na kolejne dni, zaobserwowano szybkie rozpuszczenie hydrożelu GelMa przy ominięciu etapu

zmiany pożywki, natomiast przy zmianie pożywki trójwymiarowa hodowla utrzymywała się przez około 10-14 dni.



Rysunek 5.10. Obserwacje mikroskopowe wzrostu komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Skala 2000 µm.



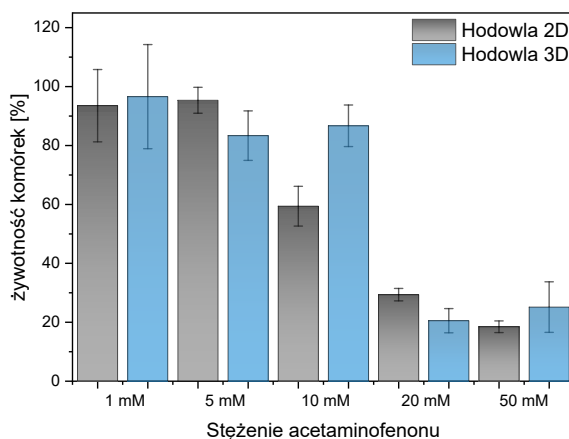
Rysunek 5.11. Obserwacje mikroskopowe morfologii komórek linii HepG2 w hodowli 2D oraz 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Skala 1000 µm.

5.4.3 Ocena wpływu acetaminofenonu na komórki HepG2 w hodowli 2D i 3D

W celu określenia wpływu acetaminofenonu na komórki HepG2 w hodowli na rusztowaniach hydrożelowych, a także porównania tych badań metodą elektrochemiczną ten etap badań rozpoczęto od testów wstępnych określenia wpływu acetaminofenonu w hodowli 2D z wykorzystaniem 96-dółkowych płytek oraz w hodowli 3D z wykorzystaniem 24-dółkowych płytek. W przypadku hodowli 2D badania prowadzono z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^5 komórek/ml, a ocenę wpływu acetaminofenonu przeprowadzono po 24h od wysiania

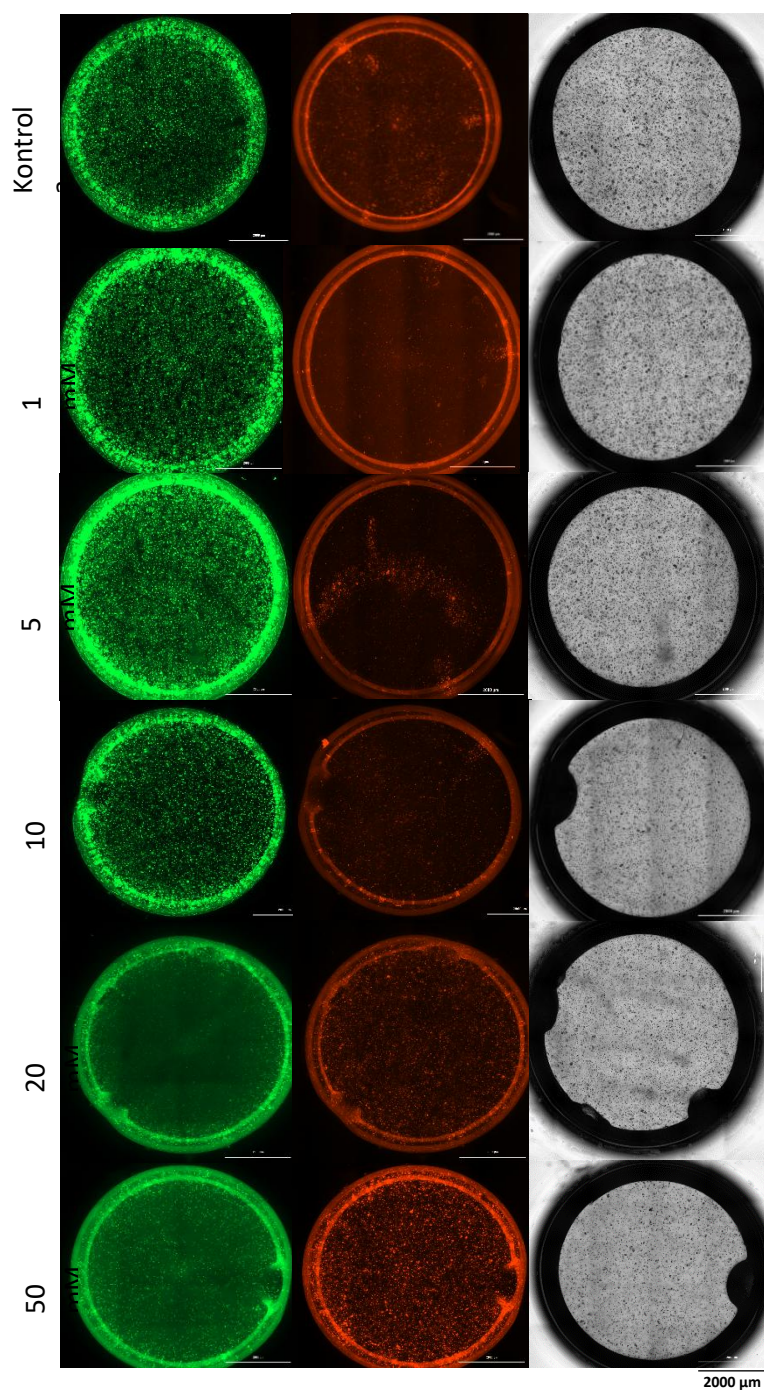
komórek. Hodowlę 3D uzyskano na drodze enkapsulacji zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^6 komórek/ml w hydrożelu GelMa o stężeniu 10%, a ocenę wpływu acetaminofenu przeprowadzono po 48h od enkapsulacji. Komórki w obu hodowlach inkubowano z roztworem acetaminofenu o stężeniach 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM i 50 mM przez 24h. W celu określenia proliferacji i żywotności komórek w otrzymanych hodowlach 3D na hydrożelowych rusztowaniach, przeprowadzono test z wykorzystaniem barwnika CTB oraz barwienie różnicowe z wykorzystaniem jodku propidyny i kalceiny-AM.

Analiza uzyskanych wyników potwierdziła toksyczny wpływ acetaminofenu również na komórki linii HepG2 w hodowli 3D z wykorzystaniem rusztowań hydrożelowych. Na podstawie analizy wyników przedstawionych na Rysunku 5.12. zaobserwowano, podobny wpływ acetaminofenu o stężeniu 1 mM oraz 5 mM na komórki w obu typach hodowli. W hodowli 2D zaobserwowano, że wraz ze zwiększeniem stężenia acetaminofenu, żywotność komórek malała proporcjonalnie do zwiększenia stężenia acetaminofenu. Dla stężenia 1mM uzyskano największą żywotność w hodowli (93%), a dla stężenia 50 mM najmniejszą (18%). W hodowli 3D na podłożu hydrożelowym dla stężenia 1 mM uzyskano żywotność na poziomie 96%. Dla stężenia 5mM oraz 10 mM podobnie żywotność zmalała o około 20% w stosunku do kontroli. Natomiast dla stężeń 20 mM oraz 50 mM uzyskano żywotność odpowiednio mniejszą 20% i 25%. Przeprowadzone barwienie różnicowe potwierdziło wyniki uzyskane metodą barwienia CTB. Na Rysunku 5.13. można zaobserwować znaczną przewagę komórek martwych w przypadku najwyższych stężeń - 20 mM oraz 50 mM.



Rysunek 5.12. Porównanie żywotności komórek linii HepG2 w standardowej hodowli 2D oraz w trójwymiarowej hodowli komórkowej na rusztowaniach hydrożelowych GelMa w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.

Uzyskane wyniki wskazują na znaczący wpływ obecności rusztowań hydrożelowych na proliferację i żywotności komórek. Rusztowania hydrożelowe mogły stanowić barierę utrudniającą dyfuzję badanego związku w głąb struktury hydrożelowej. Można również zauważyć, że hydrożelowe struktury, nie zostały rozpuszczone zachowując okrągłą postać. Bezpośrednia ekspozycja acetaminofenu na komórki linii HepG2 w hodowli 2D znacząco wpływa na wzrost cytotoksyczności badanego związku. Wykonanie barwienia różnicowego potwierdziło znaczą przewagę komórek żywych w przypadku kontroli oraz stężenia 1 mM, 5 mM oraz 10 mM oraz przewagę komórek martwych w przypadku 20 mM oraz 50 mM. Obserwacje przedstawiono na Rysunku 5.13.



Rysunek 5.13. Barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM (kolor zielony – komórki żywe) oraz jodka propidyny (kolor czerwony - komórki martwe). Inkubacja z roztworem acetaminofenonu o stężeniach 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM oraz 50 mM. Skala 2000 μm .

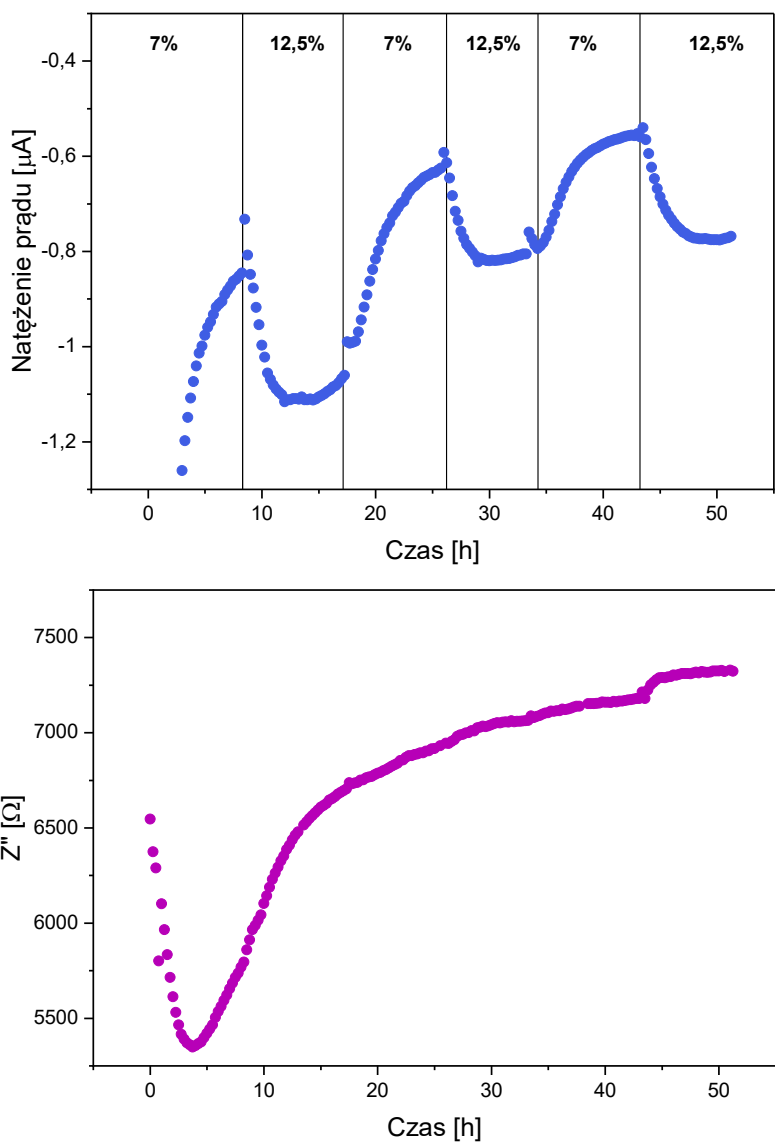
5.4.4. Monitorowanie parametrów metabolicznych metodą elektrochemiczną w trójwymiarowej hodowli komórkowej komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa

5.4.4.1. Możliwość wykorzystania elektrod złotych do oznaczania tlenu cząsteczkowego w hodowli 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa

W celu wykorzystania opracowanego układu do statycznych trójwymiarowych hodowli komórkowych, sprawdzono odpowiedź wytworzonych elektrod podczas zmiany stężenia tlenu. W tym celu w układzie umieszczono 200 μ l mieszaniny prekursora hydrożelu GelMa i poddano go sieciowaniu. Podobnie jak w Rozdziale 4.4.1.1 sprawdzono trzykrotnie odpowiedź elektrod dla dwóch różnych stężeń tlenu 12,5% oraz 7%.

Przeprowadzony pomiar (Rysunek 5.14.) wykazał, że elektrody reagują na zmianę stężenia tlenu również w obecności rusztowań hydrożelowych GelMa. W porównaniu do wyników w samej pożywce komórkowej, zaobserwowano szybszą stabilizację czujników oraz porównywalną amplitudę wartości natężenia prądu w pierwszym cyklu zmian stężenia tlenu w inkubatorze. W kolejnym cyklu amplituda była dużo mniejsza. Wynosiła ona $0,58 \pm 0,02 \mu\text{A}$; $0,43 \pm 0,04 \mu\text{A}$, w czasie 8,25h (dla $n=4$). Po 30h pomiaru zaobserwowano znaczne wypłaszczenie sygnału. Zaobserwowane zmiany mogą świadczyć o adsorpcji substancji z pożywki hodowlanej na elektrodach tzw. foulingu i zwiększonej odpowiedzi na hydrożel umieszczony bezpośrednio na elektrodach.

Dodatkowo przeprowadzono pomiar EIS dla układu w obecności rusztowań hydrożelowych. Początkowo przez pierwsze 4h obserwowano spadek sygnału impedancji, a następnie obserwowano wzrost wartości EIS. Przez kolejne około 10h obserwowano logarytmiczny wzrost, a potem sygnał uległ wypłaszczeniu. Na wszystkich 8 elektrodach otrzymano podobny trend odpowiedzi.

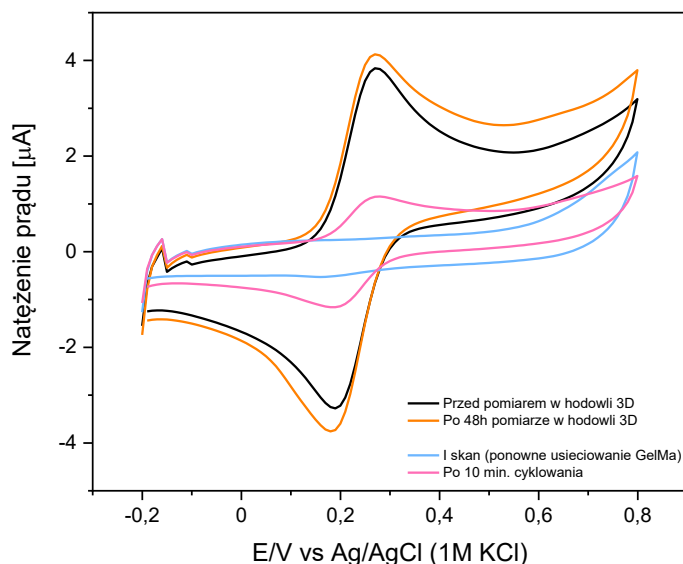


Rysunek 5.14. Odpowiedź elektrod dla pomiaru w dwóch różnych stężeniach tlenu (12,5% oraz 7%) w pożywce hodowlanej w obecności rusztowań hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.

5.4.4.2. Ocena stabilności elektrod podczas pomiarów w hodowli 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa.

W trakcie pracy sprawdzono również odpowiedź elektrod w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ 0,1 M KCl. Przed pomiarami rutynowo sprawdzano odpowiedź elektrod w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ 0,1 M KCl, natomiast postanowiono ocenić również wpływ hydrożelu GelMa na trwałość elektrod. Jak zauważono w niektórych przypadkach, materiał odklejał się pod wpływem długiego nacisku elementu PDMS, co było spowodowane utlenieniem warstwy chromu lub tytanu podczas procesu napyłania. Trwałość elektrod można było również ocenić podczas czyszczenia z wykorzystaniem ultradźwięków.

W pierwszym etapie pomiar poprowadzono przed, a następnie po 48h hodowli komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa. Następnie na wyczyszczonej elektrodzie ponownie usieciowano matrycę hydrożelową (o wysokości 3 mm) bez zawiesiny komórkowej i dodano roztworu 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ 0,1 M KCl. Pomiar przeprowadzono natychmiast po dodaniu roztworu i sprawdzano odpowiedź dla różnych szybkościach zmian potencjału. Po upływie 10 min zaobserwowano pojawienie się pierwszego sygnału od próbnika redox. Wyniki przedstawiono na Rysunku 5.15.

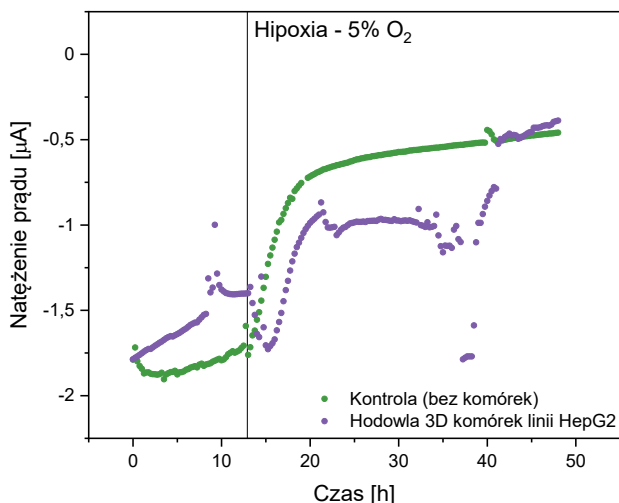


Rysunku 5.15. Ocena stabilności elektrod podczas pomiarów w hodowli 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s

5.4.4.2. Ocena wpływu warunków obniżonego stężenia tlenu na proliferację komórek linii HepG2 w hodowli 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa

W kolejnym etapie badań sprawdzono również sygnał w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂). W badaniu wykorzystano elektrody złote, które zostały wykonane metodą napylenia na szklane płytki (Rozdział 2.3.3.). Hodowlę 3D uzyskano na drodze enkapsulacji zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^6 komórek/ml w hydrożelu GelMa umieszczonej bezpośrednio na macierzy elektrodowej w komorze hodowlanej o średnicy 10 mm. Wyniki zaprezentowano na Rysunku 5.16.

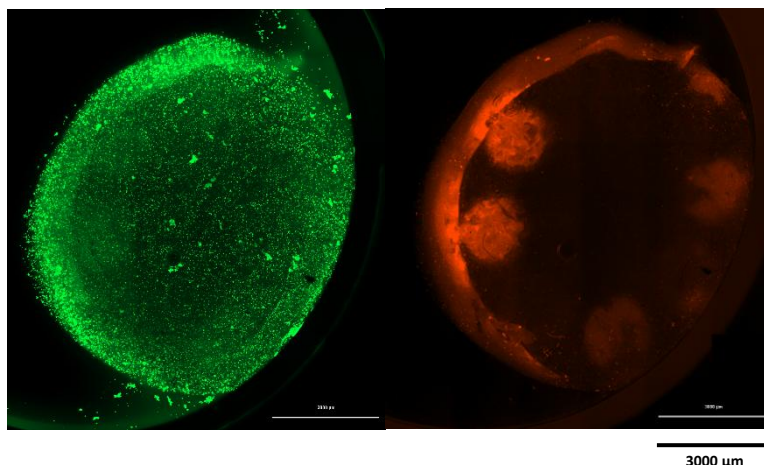
W przypadku obu pomiarów (zarówno kontrolnego jak i w obecności komórek) na początku obserwowano spadek wartości natężenia prądu, a więc spadek lokalnego stężenia tlenu w warstwie przyelektrodowej. Po 13h hodowli zmieniono zawartość stężenia tlenu w inkubatorze na 5% i obserwowano sygnał czujników w warunkach obniżonej zawartości tlenu. W przypadku kontroli obserwowano podobną odpowiedź jak w przypadku kontroli bez matrycy hydrożelowej (Rysunek 4.14.) oraz odpowiedzi dla pomiaru w dwóch różnych stężeniach tlenu (Rysunek 5.14.) Logarytmiczny spadek stężenia tlenu przez około 7h, a następnie stabilizację sygnału. W przypadku hodowli komórkowej 3D początkowo przez 2h obserwowano wzrost wartości natężenia prądu, a następnie spadek wartości natężenia prądu (podobnie jak w przypadku kontroli). Następnie obserwowano niewielki wzrost (co prawdopodobnie wynika z problemów z ustawieniami inkubatora) oraz stabilizację sygnału w dalszej części pomiaru. Po 35h wartości natężenia prądu nieoczekiwanie wzrosły, a później gwałtownie spadły ponownie. Zaburzenia sygnału w trakcie ostatnich godzin (od 35h) pomiaru w hodowli 3D jest spowodowany nagłym problemami technicznymi z inkubatorem.



Rysunek 5.16. Odpowiedź czujników tlenu w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂) w hodowli komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa oraz kontroli (matryca hydrożelowa bez obecności komórek). Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.

Po zakończonym pomiarze wykonano barwienie różnicowe z wykorzystaniem jodku propidyny (PI) i kalceiny-AM, w celu określenia proliferacji i żywotności komórek. Test wykonano z wykorzystaniem płytki 24-dołkowej, dlatego niezbędna była dekonstrukcja układu i przeniesienie hodowli.

Analiza mikroskopowa przedstawiona na Rysunku 5.17, pokazała dużą obecność żywych komórek (kolor zielony). Szczególne ich nagromadzenie zauważono na brzegach hodowli. Intensywność koloru zielonego (ramki) wokół hydrożelu wynika z załamania światła podczas analizy mikroskopowej^[13]. Na zdjęciu po prawej dla barwienia PI widoczne są fragmenty elektrod, które pozostały na warstwie hydrożelu na skutek przenoszenia układu. Na zdjęciu po lewej słabo widać komórki martwe, być może ze względu własną fluorescencję pozostałości po elektrodzie złotej. Przy dokładniejszej analizie zdjęć widoczne były pojedyncze martwe komórki, jednak ich ilość była nieporównywalnie mniejsza niż komórek żywych.



Rysunek 5.17. Barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM (kolor zielony – komórki żywe) oraz jodkiem propidyny (kolor czerwony - komórki martwe). Inkubacja w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5%). Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi Z. Skala 3000 μm .

5.4.4.3. Ocena wpływu acetaminofenonu na komórki linii HepG2 w hodowli 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa metodą elektrochemiczną

Na podstawie wstępnych badań opisanych w Rozdziale 5.3.2. w zaprojektowanym układzie do pomiarów elektrochemicznych w statycznych hodowlach komórkowych, przeprowadzono ocenę wpływu acetaminofenonu na komórki HepG2 w trójwymiarowej hodowli na rusztowaniach hydrożelowych GelMa. W badaniu wykorzystano elektrody złote, które zostały wykonane metodą napylenia na szklane płytki (Rozdział 2.3.3.). Hodowlę 3D uzyskano na drodze enkapsulacji zawiesiny komórkowej o gęstości 1×10^6 komórek/ml w hydrożelu GelMa umieszczonej bezpośrednio na elektrodzie w dołku hodowlanym o średnicy 10 mm. Ocenę wpływu acetaminofenonu przeprowadzono po 48h od enkapsulacji. Komórki inkubowano z roztworem acetaminofenonu o stężeniach 1 mM, 10 mM, i 50 mM przez 24h. Monitorowanie poziomu rozpuszczonego tlenu w hodowli oraz adhezji komórek na powierzchni hodowlanej przeprowadzono za pomocą czujników z detekcją elektrochemiczną. Po zakończeniu hodowli wykonano barwienie różnicowe z wykorzystaniem jodku propidyny i kalceiny-AM, w celu określenia proliferacji i żywotności komórek. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 5.18-5.22.

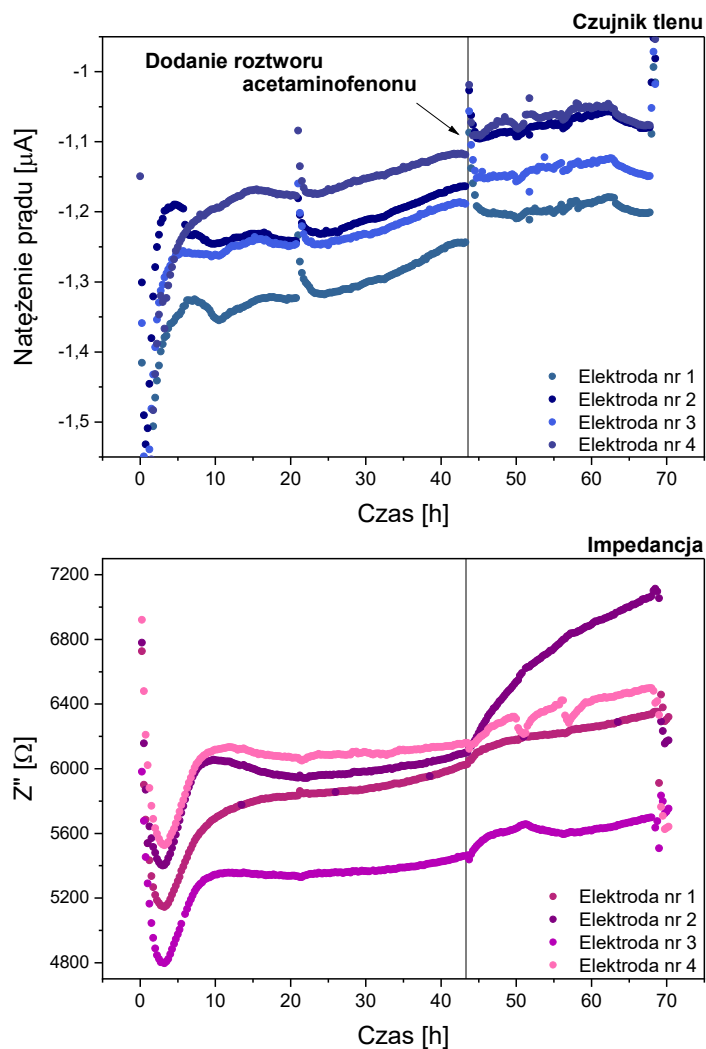
W przypadku czujników tlenu w trakcie pierwszej godziny obserwowano wzrost wartości natężenia prądu. Prawdopodobnie jest on związany bardziej ze zmianą

temperatury niż, z samymi procesami komórkowymi. Następnie przez 4-5h obserwowano gwałtowny ciągły spadek wartości natężenia prądu dla stężenia 1 mM oraz 10 mM. Następnie do 48h hodowli można zaobserwować na voltamperogramach stabilny spadek wartości natężenia prądu. Pokazuje to stabilne warunki tlenowe w warstwie przyelektrodowej. Był to okres, w którym nastąpiła adhezja komórek do podłoża oraz ich dalsza proliferacja i podział. Po 48h hodowli do układu dodawano pożywkę z roztworem acetaminofenonu.

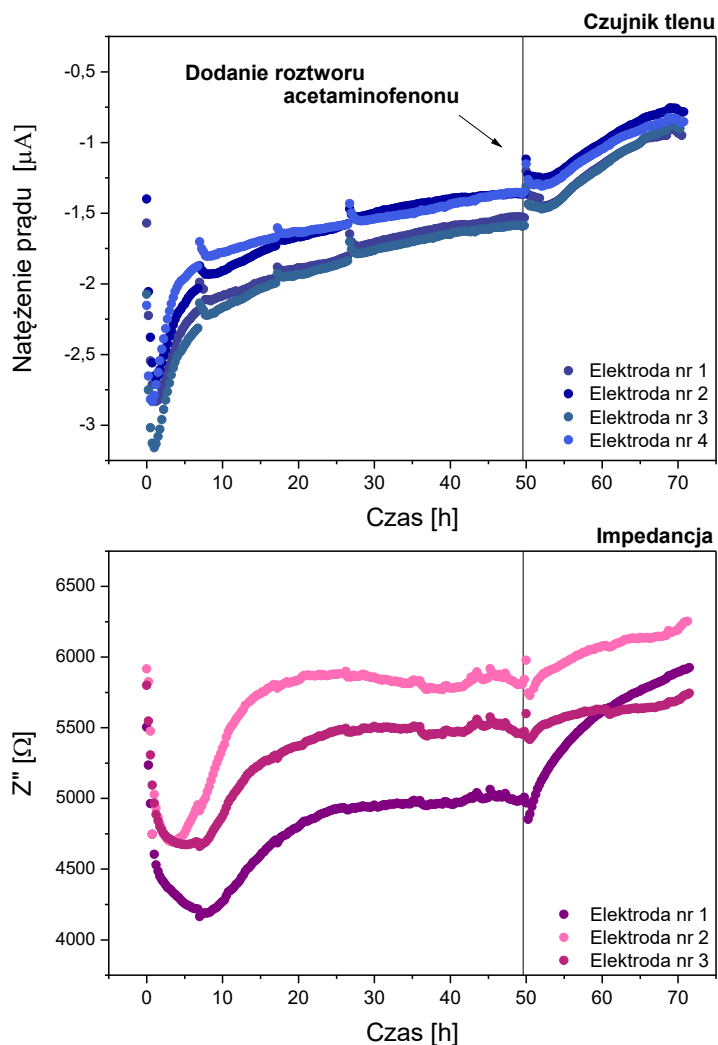
W przypadku stężenia 1 mM, zaobserwowano oczekiwany dalszy stabilny sygnał prądowy, świadczący o niewielkim wpływie roztworu acetaminofenonu o stężeniu 1 mM na komórki. Barwienie różnicowe pozwoliło potwierdzić efekt uzyskany metodą elektrochemiczną, na Rysunku 5.22. widać znaczącą przewagę żywych komórek. W przypadku inkubacji z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 10 mM, po podaniu związku po około 2h zauważono znaczący spadek wartości natężenia prądu, świadczący o dużym zmniejszeniu stężeniu tlenu rozpuszczonego w medium w warstwie przyelektrodowej.

W przypadku inkubacji z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 50 mM, przed zmianą pożywki obserwowano wzrost wartości natężenia prądu, informujący o lokalnym wzroście stężenia tlenu rozpuszczonego w warstwie przyelektrodowej, co mogło być wynikiem znaczącego rozpuszczenia się podłoża hydrożelowego, a w konsekwencji zmiany wysokości warstwy dyfuzyjnej. Przez pierwsze 6h od zmiany pożywki (czyli od 45h pomiaru do 51h) obserwowano dalszy wzrost wartości natężenia prądu, a następnie nagły spadek natężenia prądu, pokazujący zmieniające się warunki tlenowe. Podobny sygnał (gwałtowny wzrost stężenia tlenu oraz późniejszy jego spadek) uzyskano dla pomiarów w hodowli 2D z dodaniem DMSO. Być może jest to również efekt toksyczny efekt działania acetaminofenonu, a w konsekwencji śmierci komórek.

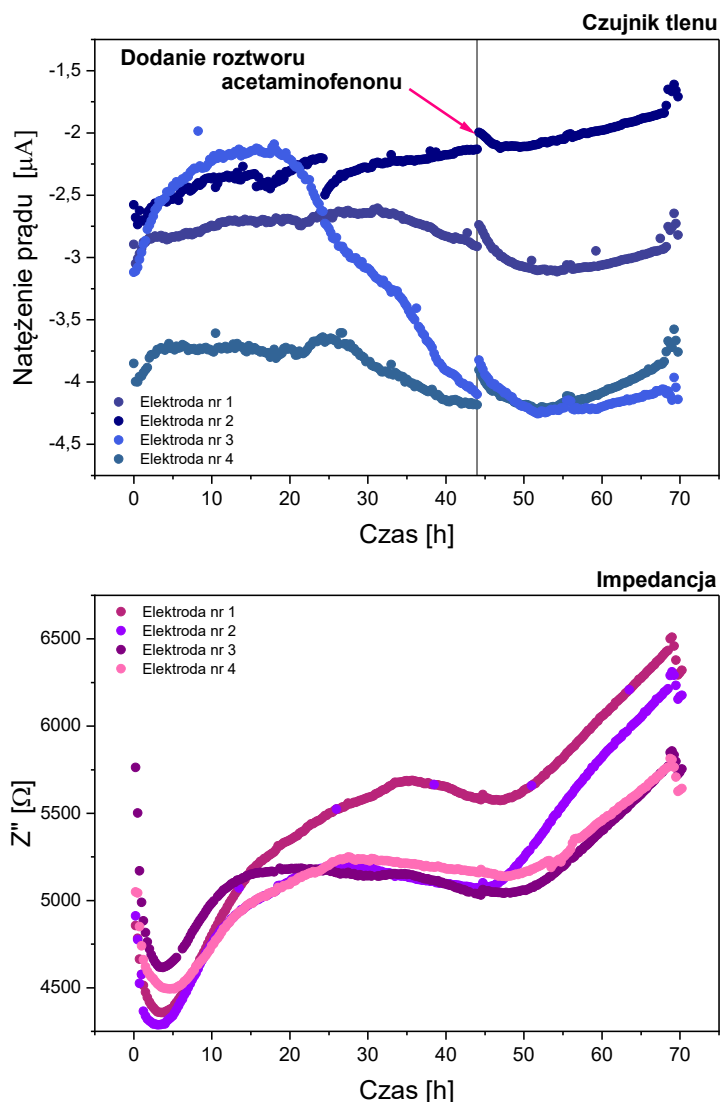
W przypadku pomiarów EIS początkowo obserwowano sygnał podobny do sygnału uzyskanego w hodowli 2D w Rozdziale 4, czyli spadek, a następnie wzrost wartości impedancji do mniej więcej 24h hodowli. Przez następne 24h obserwowano stabilizację sygnału, aż do podania związku acetaminofenonu. W przypadku stężenia 1 mM na trzech elektrodach obserwowano dalej stabilny sygnał impedancji, natomiast dla jednej elektrody otrzymano gwałtowny wzrost wartości impedancji. Z kolei w przypadku stężenia 10 mM otrzymano odwrotny sygnał. Dla jednej elektrody otrzymano stabilny sygnał, natomiast dla trzech pozostałych wzrost wartości impedancji. W przypadku stężenia dla 50 mM dla wszystkich elektrod obserwowano gwałtowny wzrost wartości impedancji po podaniu związku.



Rysunek 5.18. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas 48h hodowli oraz 24h inkubacji komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%, z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 1 mM.



Rysunek 5.19. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas 48h hodowli oraz 24h inkubacji komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%, z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 10 mM.



Rysunek 5.20. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas 48h hodowli oraz 24h inkubacji komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%, z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 50 mM.

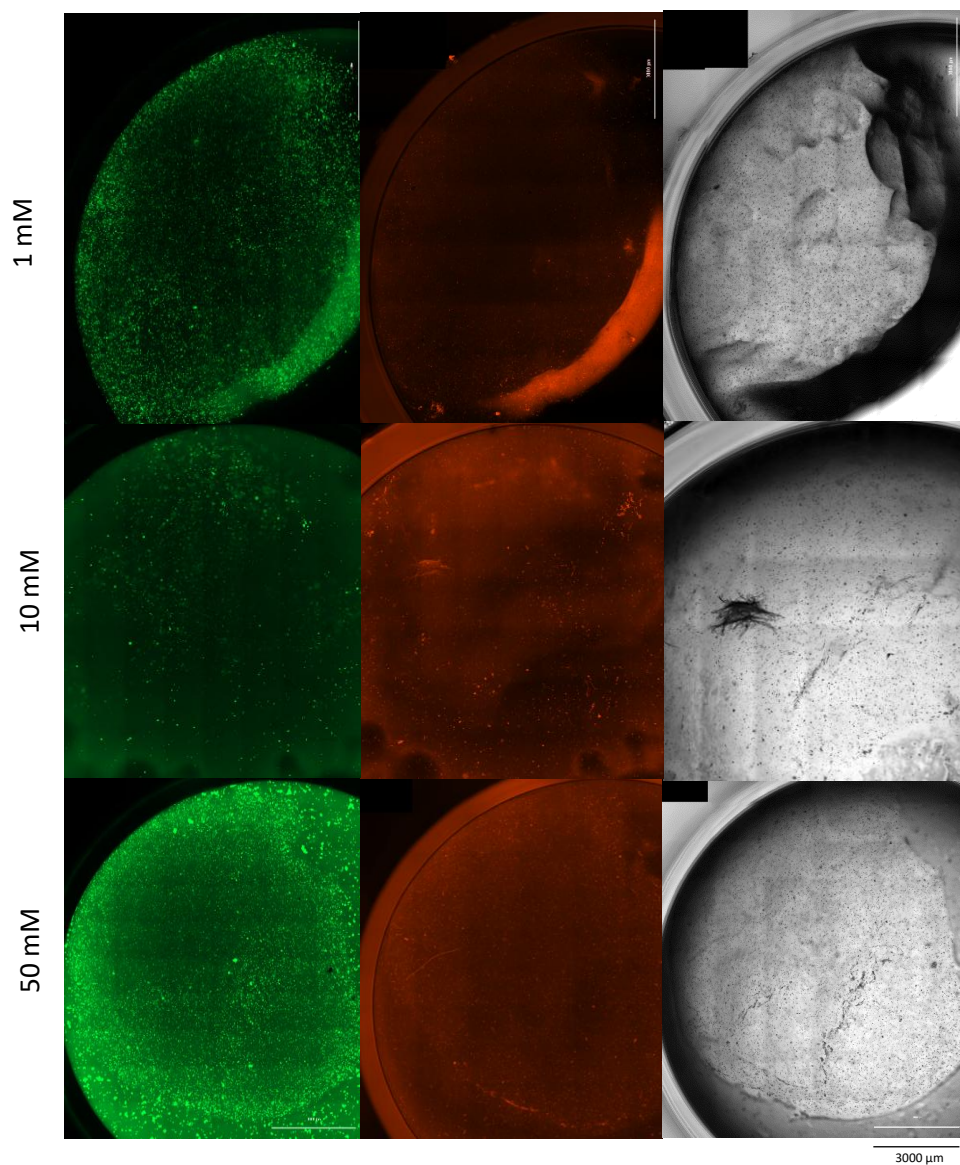
Po każdym pomiarze przeprowadzono barwienie różnicowe. Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem wielofunkcyjnego czytnika płytek, dlatego było też niezbędna dekonstrukcja układu i przeniesienie każdej hodowli 3D na 24-dółkową płytkę. Podczas dekonstrukcji układu, po odłączeniu elementu PDMS od płytki z elektrodami za każdym razem obserwowano rozlanie hodowli na szklaną podstawę i brak stabilnego kształtu hodowli 3D (Rysunek 5.21.). Jest to wynikiem częściowego

rozpuszczenia się hydrożelu podczas 3 dniowej hodowli, a również prawdopodobnie niecałkowitego usieciowania hydrożelu, ze względu na większą wysokość elementu PDMS niż wysokość utworzonej hodowli na matrycy hydrożelowej.



Rysunek 5.21. Hodowla 3D komórek linii HepG2 na rusztowaniu hydrożelowym GelMa po dekonstrukcji całego układu pomiarowego.

Badania wstępne z wykorzystaniem mniejszych konstruktów hydrożelowych potwierdzają prawidłowy przepływ roztworu acetaminofenonu w hydrożelu. Można zatem założyć, że wpływ acetaminofenonu w układzie pomiarowym był podobny. Niestety wykonane barwienie różnicowe oraz zdjęcia mikroskopowe (Rysunek 5.22) nie wskazują jednoznacznie na istotne różnice w podawanych stężeniach. Jednym z powodów może być rozpuszczenie fragmentów hydrożelu, również widoczne na zdjęciach.



Rysunek 5.22. Barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM (kolor zielony – komórki żywe) oraz jodkiem propidyny (kolor czerwony - komórki martwe). Inkubacja z roztworem acetaminofenonu o stężeniu 1 mM, 10mM oraz 50 mM. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi Z. Skala 3000 µm.

5.5. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania w niniejszym rozdziale potwierdzają możliwość wykorzystania rusztowań hydrożelowych w trójwymiarowych hodowlach komórek linii HepG2. Testy z wykorzystaniem mniejszych konstruktów żelowych pokazują zachowanie strukturalnej całości hodowli powyżej 7 dni, przy regularnej zmianie pożywki. Dodatkowo inkubacja komórek w roztworze z acetaminofenonem, i późniejsze barwienia różnicowe wskazują na prawidłowy przepływ roztworów przez strukturę hydrożelu. Potwierdza to możliwość wykorzystania trójwymiarowych hodowli komórkowych na rusztowaniach hydrożelowych do badania wpływu związków na komórki.

Przeprowadzone badania w układzie pomiarowym pokazują, że nie jest on jednak odpowiedni do przeprowadzenia tego typu badań przy obecnej architekturze i konieczna jest jej zmiana w dalszych pomiarach. Największym czynnikiem wpływającym na jest zbyt duża średnica komory hodowlanej. Konstrukty hydrożelowe o większej średnicy szybciej się rozpuszczają, zmieniając długość warstwy dyfuzyjnej i znacząco wpływając na wyniki pomiaru.

Podczas eksperymentów, komórki zostały enkapsulowane w objętości 200 μ l, a sieciowanie odbyło się bezpośrednio w układzie. Powodowało to bezpośrednie „zanurzenie” elektrod w hydrożelu, a jednocześnie pewność, że sygnał pomiarowy pochodził bezpośrednio z hydrożelu, a nie z pożywki komórkowej. Wykorzystanie konstruktów żelowych o mniejszej średnicy, mogłoby spowodować brak uzyskania sygnału pomiarowego z hodowli komórkowej, a jedynie z pożywki komórkowej, co na pewno pozwoliło by uzyskać dodatkową informację analityczną, jednak bez analizy mikroskopowej nie jest możliwe określenie położenia hodowli i prawidłowego sygnału pochodzącego z elektrod. Dodatkowo zmiana pożywki lub podanie badanego związku może wpływać na przesunięcie całego konstruktów hydrożelowych powodując zmianę sygnału pochodzącego z elektrod.

Jednym z rozwiązań, które można by zastosować jest zmniejszenie samej komory hodowlanej, przy jednoczesnym zmniejszeniu zastosowanych elektrod lub przy zmniejszeniu średnicy elektrod, prowadząc do skomplikowania procedury wytworzenia elektrod. Z kolei zastosowanie dodatkowego np. w postaci ograniczającego objętość hydrożelu np. wytworzonego za pomocą druku 3D, siateczki z PLLA, również powoduje konieczność zastosowania dodatkowej izolacji elektrod.

Ważnym czynnikiem układu jest położenie elektrod, które w tym układzie jest możliwe tylko na dnie komory hodowlanej. Potrzebne jest zatem zastosowanie elektrod, które umożliwiły by pomiar tlenu w całej objętości hodowli 3D nie wpływając negatywnie na enkapsulowane komórki. Mogą one odmiennie reagować ze względu na położenie, a szczególnie usytuowanie skrajnie lub centralnie wewnątrz rusztowań hydrożelowych, na przykład na zmniejszenie metabolizmu.

5.6. Literatura

1. Caliri SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods*. 2016;13(5):405-414.
2. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2005;23(1):47-55.
3. Schmidt JJ, Rowley J, Kong HJ. Hydrogels used for cell-based drug delivery. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87A(4):1113-1122.
4. Cushing MC, Anseth KS. Hydrogel cell cultures. *Science*. 2007;316(5828):1133-1134.
5. Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules*. 2000;1(1):31-38.
6. Pepelanova I, Kruppa K, Scheper T, Lavrentieva A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering*. 2018;5(3):55.
7. Leu Alexa R, Iovu H, Ghitman J, et al. 3D-Printed Gelatin Methacryloyl-Based Scaffolds with Potential Application in Tissue Engineering. *Polymers*. 2021;13(5):727.
8. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010;31(21):5536-5544.
9. Benton JA, DeForest CA, Vivekanandan V, Anseth KS. Photocrosslinking of Gelatin Macromers to Synthesize Porous Hydrogels That Promote Valvular Interstitial Cell Function. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(11):3221-3230.
10. Fairbanks BD, Schwartz MP, Bowman CN, Anseth KS. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*. 2009;30(35):6702-6707.
11. Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*. 2015;73:254-271.
12. Shirahama H, Lee BH, Tan LP, Cho NJ. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Sci Rep*. 2016;6(1):31036.
13. Schmitz C, Pepelanova I, Seliktar D, et al. Live reporting for hypoxia: Hypoxia sensor-modified mesenchymal stem cells as in vitro reporters. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117(11):3265-3276.

14. Schmitz C, Potekhina E, Irianto T, Belousov VV, Lavrentieva A. Corrigendum: Hypoxia Onset in Mesenchymal Stem Cell Spheroids: Monitoring With Hypoxia Reporter Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:954422.
15. Kumagai A, Ando R, Miyatake H, et al. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. *Cell.* 2013;153(7):1602-1611.
16. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol Cell.* 2010;40(2):294-309.

6. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań

Odwzorowanie warunków *in vivo* jest jednym z największych wyzwań technologicznych w obecnych czasach. Znaczne postępy w dziedzinie biomateriałów umożliwiły stworzenie wielu trójwymiarowych modeli komórkowych. Jednym z ich kluczowych aspektów jest monitorowanie parametrów metabolicznych komórek. Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu m.in. optycznych lub elektrochemicznych czujników, jednak wprowadzanie czujników do układu powoduje większe skomplikowanie architektury układu i samego procesu jego fabrykacji.

Integracja oraz miniaturyzacja czujników elektrochemicznych jest pracochłonna i kosztowna, pozwala jednak na pomiar o wyższej czułości i krótszym czasie odpowiedzi w porównaniu do metod optycznych. Dodatkową zaletą jest możliwość integracji wielu czujników w jednym układzie umożliwiającą pomiar wielu metabolitów w tym samym czasie.

W związku z tym w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę opracowania czujników elektrochemicznych, które mogłyby posłużyć w analizie parametrów metabolicznych komórek w hodowlach komórkowych *in vitro*, a w szczególności zmian stężenia tlenu w długoterminowej hodowli komórek.

W pierwszej części pracy przedstawiono badania dotyczące wpływu polimerów przewodzących oraz makrocyclicznych związków metali przejściowych na przesunięcie potencjału początku fali katalitycznej w procesie redukcji tlenu. Porównano trzy typy elektrod - komercyjne elektrody złote, elektrody złote wytworzone metodą napyłania w wysokiej próżni oraz elektrody wytworzone metodą druku 3D. Największy wpływ zastosowanych materiałów zauważono w przypadku elektrod wytworzonych metodą druku 3D, co otwiera możliwości dalszych kierunków badań. Natomiast proces napyłania elektrod złotych umożliwił w sposób powtarzalny otrzymanie trwałych elektrod o stabilnej aktywnej powierzchni, co pozwoliło ich dalsze wykorzystanie w hodowli komórkowej.

W kolejnej części zaprezentowano badania nad warstwami przeciwporostowymi elektrod w hodowlach komórkowych. Uzyskane wyniki oraz obserwacje z kolejnych rozdziałów potwierdzają znaczny wpływ środowiska hodowli komórkowej na czułość wykorzystywanych elektrod. Spośród 11 wybranych materiałów o właściwościach przeciwporostowych, najbardziej skutecznym materiałem przeciwporostowym dla elektrod węglowych w hodowli komórkowej okazała się modyfikacja na bazie krzemianu. Dodatkowy test cytotoksyczności badanej warstwy oraz analiza mikroskopowa nie wykazała znaczących efektów toksycznych dla linii komórkowej HeLa. Badania te obrazują konieczność przeprowadzenia badań każdorazowo dla końcowej zawartości analizowanej próbki, bowiem zmienność składu pożywki hodowlanej może znacząco wpłynąć na stabilność warstw przeciwporostowych i charakterystykę analityczną czujników.

W rozdziale czwartym i piątym wykorzystano opracowaną macierz 8-elektrodową elektrod złotych napyłanych metodą w wysokiej próżni do pomiarów w hodowlach komórkowych. Zaprezentowany szereg badań własnych potwierdza możliwości wykorzystanego układu w monitorowaniu hodowli komórkowych, zarówno dwuwymiarowych jak i trójwymiarowych hodowlach komórkowych.

Opracowane elektrody złote charakteryzowały się czułością na poziomie $76,8 \pm 6.5$ nA/% w zakresie niskich stężeń tlenu (2-18% O₂), czyli $7,7 \pm 0,6$ nA/ μ M tlenu rozpuszczonego w pożywce. Istotnym aspektem jest wpływ temperatury na mierzone natężenie prądu. Zauważono, że stabilizacja sygnału na początku pomiaru mieści się w czasie ok 5-10h. Opracowane elektrody jednak pozwalają tylko na obserwację zmian stężenia tlenu w hodowli, a nie na pomiar ilościowy.

Pomiar impedancji pozwolił na monitorowanie adhezji komórek podczas inkubacji z roztworem acetaminofenu. Jednak w pomiarach z dodatkiem roztworu DMSO, wpływ związku był zauważalnie większy niż spodziewana dysocjacja komórek z powierzchni elektrod. Istotne jest zatem wykonanie szeregu dodatkowych pomiarów kontrolnych i wpływu podawanych związków na przewodność roztworu. Zauważono również mniejszą powtarzalność sygnału pomiędzy wykorzystywanymi elektrodami, a elektrodami ITO w pomiarze impedancji dlatego w kolejnym projekcie należałoby wrócić do optymalizacji procesu macierzy elektrod ITO/Au.

W trakcie badań zaobserwowano również obniżoną żywotność komórek linii HepG2 w układzie pomiarowym, która może być związana z właściwościami adhezyjnymi lub samym składem szklanej podstawy macierzy elektrodowej. Dlatego należałoby również zbadać dokładnie właściwości adhezyjne komórek na wykorzystywanej macierzy. Dodatkowe pokrycie płytki kolagenem lub fibrynogenem mogłoby ułatwić adhezję komórek w komorze hodowlanej, jednak może wpływać równocześnie na sygnał mierzonych wartości natężenia prądu oraz pomiarów impedancji.

Natomiast w kolejnym projekcie należałoby ponownie zwrócić uwagę na architekturę wykorzystywanego układu. Jednym z ważniejszych czynników jest otwarta architektura komory hodowlanej, która choć ułatwia podawanie badanych związków, powoduje nadmierne parowanie pożywki i umożliwia pojawienie się zakażeń w układzie. Być może należałoby rozważyć na macierzy elektrodowej dodanie elektrody pseudoreferencyjnej, która umożliwiłaby pracę w zamkniętym układzie pomiarowym. Istotnym aspektem prowadzenia hodowli są również obserwacje mikroskopowe. Obecny układ uniemożliwia obrazowanie w większym przybliżeniu.

W kontekście zastosowań układu pomiarowego w trójwymiarowych hodowlach komórkowych problemem jest zbyt duża średnica komory hodowlanej. Struktury hydrożelowe o większej średnicy szybciej się rozpuszczają, zmieniając długość warstwy dyfuzyjnej i znacząco wpływając na wyniki pomiaru. Jednym z możliwych rozwiązań, jest zmniejszenie samej komory hodowlanej, przy jednoczesnym zmniejszeniu średnicy elektrod. Wykorzystanie kilku czujników tego samego typu,

jest istotne, ze względu na często niejednorodną dystrybucję komórek w komorze hodowlanej. Powinno się również rozważyć zastosowanie dodatkowego zabezpieczenia ograniczającego przemieszczanie się hydrożelu, np. wytworzonego za pomocą druku 3D, tak aby zmiana pożywki hodowlanej lub podanie związku nie wpływało bezpośrednio na zniszczenie matrycy hydrożelowej.

Ważnym czynnikiem układu jest położenie elektrod, które w tym układzie jest możliwe tylko na dnie komory hodowlanej. Potrzebne jest zatem zastosowanie elektrod, które umożliwiłyby pomiar tlenu w całej objętości hodowli 3D nie wpływając negatywnie na enkapsulowane komórki. Mogą one odmiennie reagować ze względu na położenie, a szczególnie usytuowanie skrajne lub centralne wewnątrz rusztowań hydrożelowych, na przykład na zmniejszenie metabolizmu.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły na opracowanie macierzy 8-elektrodowej, która umożliwiła monitorowanie stężenia tlenu oraz impedancji przez cały czas trwania hodowli komórkowej, zarówno w dwuwymiarowych jak i trójwymiarowych hodowlach komórkowych z wykorzystaniem rusztowań hydrożelowych.

Obecnie dostępne komercyjne czujniki pozwalają jedynie na pomiar jednego analitu, natomiast, zastosowanie wielu czujników na jednej macierzy elektrodowej pozwoliłoby na poznanie wpływu badanych związków pod różnym kątem. Rozwiązanie takie może być w przyszłości wykorzystywane do rutynowych badań, w tym w opracowaniu nowych leków i innych substancji w fazie przedklinicznej, a w szczególności może skrócić czas oceny leku i pozwolić na jego przejścia do kolejnych etapów badań.

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań są następujące:

1. Istotne jest wykorzystanie, więcej niż jednego czujnika tego samego rodzaju, na macierzy elektrodowej, w celu zrozumienia wpływu poszczególnych parametrów (np. stężenia tlenu) na żywotność komórek.
2. Ze względu na złożony skład pożywki hodowlanej, istotne jest stosowanie warstw przeciwporostowych, które pozwolą na zachowanie czułości czujników w długoterminowych badaniach w hodowli komórkowej.
3. Wykorzystywany układ pomiarowy wymaga dalszych badań nad jego architekturą, szczególnie w kontekście zastosowań do pomiarów w hodowli 3D.
4. Opracowane czujniki tlenu mogą w przyszłości pomóc w zdobyciu większej wiedzy na temat zmian stężenia tlenu podczas badań w hodowli komórkowych 2D oraz 3D oraz wpływu badanych związków na komórki.

Spis Rysunków

Rysunek 1.1.	Schematyczne przedstawienie porównania hodowli w monowarstwie (2D) oraz trójwymiarowej hodowli komórkowej. Rysunek wykonano na podstawie: [27].	22
Rysunek 1.2.	Metody hodowli sferoidalnych – metoda wiszącej kropli (A), hodowla na podłożu nieadhezyjnym (B), hodowla na podłożach z mikrowzorami (C), hodowle rotacyjne (D) oraz w układach mikroprzepływowych. Rysunek wykonano na podstawie: [56].	27
Rysunek 1.3.	Przykładowy układ mikroprzepływowy[Zdjęcie własne].	31
Rysunek 1.4.	Wdrożenie zasady 3R w projektach badań eksperymentalnych. Rysunek wykonano na podstawie: [99].	33
Rysunek 1.5.	Zasada działania czujnika analitycznego.	37
Rysunek 1.6.	Zasada działania optod światłowodowych. Rysunek wykonano na podstawie[124].	39
Rysunek 1.7.	Schemat zależności prądu całkowitego, utleniania oraz redukcji w reakcji przeniesienia jednego elektronu w równaniu Butlera – Volmera ^[131] .	43
Rysunek 1.8.	Zmiany potencjału w czasie t ^[132] .	44
Rysunek 1.9.	Przykładowa krzywa woltamperometryczna zarejestrowana podczas pomiaru metodą woltamperometrii cyklicznej ^[133] . E_{pa} – potencjał pików prądu anodowego, E_{pc} - potencjał pików prądu katodowego, i_{pa} - szczytowy prąd anodowy , i_{pc} - szczytowy prąd katodowy, E^0 - potencjał redukcji formalnej, A - początek cyklu potencjału; ; B - punkt, w którym cykl potencjału ulega odwróceniu.	44
Rysunek 1.10.	Spadek prądu faradajowskiego (I_F) i prądu pojemnościowego (I_C) wraz z wpływem czasu od nałożenia pulsu ^[127] .	46
Rysunek 1.11.	Schemat zmian potencjału w woltamperometrii fali prostokątnej ^[131] . ΔE_s - różnica potencjałów między dwoma kolejnymi stopniami schodów, E_{sw} - amplituda fali prostokątnej, f - częstotliwość.	47
Rysunek 1.12.	Schemat zmiany potencjału przykładanego do elektrody pracującej (A). Przykładowa krzywa chronoamperometryczna (B).	48

Rysunek 1.13.	Schematyczne przedstawienie obwodu zastępczego EIS. R_c - oporność całkowita, R_s - oporność zastępcza, C_s - pojemności zastępcza.	50
Rysunek 1.14.	Schematyczne przedstawienie fluktuacji napięcia przemiennego w fazie.	51
Rysunek 1.15.	Wykres Nyquista dla układu elektrochemicznego.	52
Rysunek 2.1.	Schemat rozkładu glukozy na drodze tlenowej oraz beztlenowej w komórkach zwierzęcych.	62
Rysunek 2.2.	Schemat oksydazy cytochromu C ^[25] .	66
Rysunek 2.3.	Maska z pozwalająca na precyzyjne napylenie złotych elektrod w procesie napyłania w wysokiej próżni.	70
Rysunek 2.4.	Macierz elektrodowa na której przygotowana cztery elektrody ITO (kolor biały) oraz elektrody złote przygotowane w procesie napyłania w wysokiej próżni (kolor żółty).	71
Rysunek 2.5.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane na elektrodach złotych modyfikowanych makrocycliczne związki metali przejściowych – CoTPP, CoTMPP, FeTMPPCl oraz MnTMPPCl w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.	72
Rysunek 2.6.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane na elektrodach złotych modyfikowanych warstwą polimerów przewodzących PANI, PPy, oraz PTh, a następnie FeTMPPCl w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.	73
Rysunek 2.7.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane na elektrodach złotych modyfikowanych makrocyclicznymi związkami metali przejściowych – CoTPP, CoTMPP, oraz FeTMPPCl oraz dodatkową warstwą polimeru – PPy/CoTPP, PPy/CoTMPP oraz PPy/FeTMPPCl w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.	74
Rysunek 2.8.	Woltamperogram cykliczny uzyskany dla elektrody złotej bez modyfikacji w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.	75

Rysunek 2.9.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni – elektrody ITO/Au (1), elektrody złote (2) w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w 0,1 M KCl. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s.	76
Rysunek 2.10.	Przekrój wysokości ścieżki elektrycznej elektrod złotych wytworzonych na podłożu BOROFLOAT® 33 wyznaczonej za pomocą profilometru.	77
Rysunek 2.11.	Zdjęcie powierzchni aktywnej elektrody złotej wytworzonej na podłożu BOROFLOAT® 33 utworzone za pomocą analizy profilometrycznej.	77
Rysunek 2.12.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod złotych wytworzonych za pomocą procesu napyłania w wysokiej próżni – bez modyfikacji (Au), elektrod złotych modyfikowanych tylko warstwą polipirolu (Au/PPy) oraz elektrod złotych modyfikowanych warstwą polipirolu oraz FeTMPPCl (Au/PPy/ FeTMPPCl) w roztworze PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.	78
Rysunek 2.13.	Elektroda wytworzona metodą druku 3D.	79
Rysunek 2.14.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych metodą druku 3D z PLLA zakupionego od różnych producentów - Proto-Pasta (PP), FiloAlfa (FA) oraz Print-Me (PM) w roztworze 1 mM $\text{Fc}(\text{MeOH})_2$ w 0,1 M KCl. Inset pokazuje krzywą uzyskaną dla elektrody PM. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s.	80
Rysunek 2.15.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych metodą druku 3D z PLLA od firmy Proto-Pasta (PP) i FiloAlfa (FA). Krzywe uzyskane dla elektrod nie modyfikowanych w roztworze buforowym PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.	81

Rysunek 2.16.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane dla elektrod wytworzonych metodą druku 3D z PLLA od firmy Proto-Pasta (PP) i FiloAlfa (FA). Krzywe uzyskane dla elektrod modyfikowanych nanocząstkami złota (górny wiersz) oraz elektrod modyfikowanych nanocząstkami złota, a następnie PPy oraz FeTMPPCl (dolny wiersz) w roztworze buforowym PBS o pH 7,4 w równowadze z powietrzem (linia ciągła) oraz roztworze nasyconym argonem (linia przerywana). Szybkość zmian potencjału 10 mV/s.	82
Rysunek 2.17	Elektrody LIG.	83
Rysunek 2.18.	Woltamperogram cykliczny uzyskany dla elektrod LIG w roztworze 10 mM Fc(MeOH) ₂ w 0,1 M KCl. Szybkość zmian potencjału 30 mV/s.	83
Rysunek 2.19.	Analiza mikroskopowa rozseparowania elektrod LIG przedstawiająca elektrody nierozseparowane (A) oraz odpowiednio rozseparowane (B).	84
Rysunek 2.20.	Analiza profilometryczna dla fotorezystu podczas wytwarzania elektrod metodą fotolitografii (A) oraz analiza mikroskopowa elektrod po etapie oddzielenia fotorezystu od substratu (B).	84
Rysunek 3.1.	Układ pomiarowy z wykorzystaniem zmodyfikowanych elektrod GPE. WE – elektroda pracująca, RE – elektroda odniesienia, CE – przeciwelektroda.	99
Rysunek 3.2.	Woltamperogram cykliczny (CV) otrzymany z wykorzystaniem GCE zmodyfikowanej syryngaldazyną w roztworze buforowym o pH 7,4 (A) i pożywcze do hodowli komórkowych (B).	100
Rysunek 3.3.	Elektroda grafitowa Skala 100 µm.	100
Rysunek 3.4.	Woltamperogram cykliczny otrzymany z wykorzystaniem elektrod GCE, LPE oraz ITO zmodyfikowanych warstwą syryngaldazyny w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego o różnych wartościach pH. Szybkość zmian potencjału: 100 mV/s.	101
Rysunek 3.5.	Woltamperogramy cykliczne otrzymane z wykorzystaniem elektrody SPE niemodyfikowanej w roztworze buforowym o pH 6,0, w roztworze Fc(MeOH) ₂ oraz SPE zmodyfikowanych warstwą syryngaldazyny w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego o pH 6,0. Inset przedstawia pomiar dla SPE zmodyfikowanych warstwą syryngaldazyny w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego o pH 6,0. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s.	102
Rysunek 3.6.	Mechanizm jednoetapowej reakcji syryngaldazyny.	103

Rysunek 3.7.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane z wykorzystaniem elektrod GCE zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: Nafionem i OPD oraz z wykorzystaniem elektrod grafitowych zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: OPD, PLLA oraz PLL-PEG. Pomiary prowadzono w roztworach buforowych o różnych wartościach pH. Szybkość zmian potencjału: 100 mV/s.	105
Rysunek 3.8.	Woltamperogramy cykliczne uzyskane z wykorzystaniem elektrod grafitowych zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: TMOS, TMA/TMOS, PEDGE, poliHEMA oraz z wykorzystaniem elektrod GCE zmodyfikowanych syryngaldazyną oraz pokryte wybranymi warstwami ochronnymi: BSA oraz ND. Pomiary prowadzono w roztworach buforowych o różnych wartościach pH. Szybkość zmian potencjału: 100 mV/s.	107
Rysunek 3.9.	Krzywe uzyskane metodą DPV dla elektrod grafitowych modyfikowanych syryngaldazyną i pokrytych warstwą ochronną PLLA, TMOS i PLL-PEG podczas 3-tygodniowej inkubacji elektrod w środowisku hodowli komórkowej komórek linii HeLa w układzie przedstawionym na Rysunku 3.1.	109
Rysunek 3.10.	Spadek sygnału syryngaldazyny w trakcie 3-tygodniowej inkubacji w hodowli komórkowej komórek linii HeLa. Odchylenie standardowe obliczone dla N=6.	110
Rysunek 3.11.	Ocena żywotności komórek linii HeLa po 24h hodowli na warstwach przeciwpoporostowych na płytce 96-dółkowej dla warstwy TMOS, PLL-PEG oraz PLLA, w stosunku do komórek rosnących na dółku niepokrytym warstwą przeciwpoporostową. Odchylenie standardowe obliczone dla N=6.	111
Rysunek 3.12.	Zestawienie zdjęć z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ warstw przeciwpoporostowych na żywotność komórek linii HepG2 po 24h hodowli komórek z wykorzystaniem płytki 96-dółkowej. Skala 100 μ m.	111
Rysunek 4.1.	Schematyczne przedstawienie rozkładu ksenobiotyków w organizmie. Rysunek wykonano na podstawie: ^[3,4] .	117
Rysunek 4.2.	Przekrój układu pomiarowego do statycznych hodowli komórkowych.	122
Rysunek 4.3.	Zdjęcie układu pomiarowego do statycznych hodowli komórkowych.	122

Rysunek 4.4.	Schematyczne przedstawienie macierzy czujnikowej wykorzystanej w niniejszym rozdziale.	123
Rysunek 4.5.	Krzywa kalibracji uzyskana dla elektrod złotych wytworzonych w procesie napyłania w wysokiej próżni w pożywce hodowlanej.	127
Rysunek 4.6.	Odpowiedź elektrod złotych dla pomiaru w dwóch różnych stężeniach 12,5% oraz 7% w pożywce hodowlanej. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.	127
Rysunek 4.7.	Porównanie działania optody tlenowej (kolor zielony) oraz pomiaru reakcji redukcji tlenu na elektrodzie złotej (kolor niebieski) wytworzonej w procesie napyłania w wysokiej próżni w roztworze buforowym PBS o pH 7,4. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.	128
Rysunek 4.8.	Pomiar impedancji na elektrodzie złotej podczas hodowli komórek linii HepG2. Częstotliwość 72,1 Hz.	130
Rysunek 4.9.	Krzywa kalibracji dla elektrod złotych wytworzonych w procesie napyłania w wysokiej próżni modyfikowanych oksydazą glukozową. Potencjał utleniania H_2O_2 -0,3 V.	131
Rysunek 4.10.	Woltamperogram cykliczny uzyskany na elektrodzie złotej w roztworze buforowym PBS o pH 7,4 oraz w roztworach glukozy o stężeniach 5 mM, 20 mM, 100 mM. Szybkość zmian potencjału 40 mV/s.	132
Rysunek 4.11.	Rejestracja natężenia prądu dla czujnika tlenu podczas 48h hodowli komórek linii HepG2 w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO_2). Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.	133
Rysunek 4.12.	Zestawienie wyników uzyskanych dla czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas hodowli komórek linii HepG2 w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO_2) w której pojawiło się zakażenie grzybicze. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.	134
Rysunek 4.13.	Rejestracja natężenia prądu dla czujników tlenu podczas 25h hodowli komórek linii HepG2 w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO_2) oraz przy obniżonym stężeniu tlenu (37°C, 5% O_2 , 5% CO_2) dla elektrod znajdujących się na różnych wysokościach. Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.	136
Rysunek 4.14.	Pomiar kontrolny (bez komórek) w warunkach obniżonego stężenia tlenu (37°C, 5% O_2 , 5% CO_2). Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.	136

Rysunek 4.15.	Wpływ DMSO na żywotność komórek linii HepG2 na płytce 96-dołkowej w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.	137
Rysunek 4.16.	Zestawienie zdjęć z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ DMSO o stężeniu 1% oraz 10% na morfologię komórek linii HepG2 po 24h ekspozycji komórek na DMSO na płytce 96-dołkowej w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO ₂). Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius) pozwalającym na jednoczesną inkubację i analizę mikroskopową. Skala 200 µm.	139
Rysunek 4.17.	Zestawienie wyników uzyskanych z czujników tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas kontroli (bez komórek) oraz 32h hodowli komórek linii HepG2 podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z 10% roztworem DMSO.	140
Rysunek 4.18.	Wpływ acetaminofenu na żywotność komórek linii HepG2 na płytce 96-dołkowej w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.	142
Rysunek 4.19.	Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ acetaminofenu o stężeniach 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM oraz 50 mM na morfologię komórek linii HepG2 na płytce 96-dołkowej w standardowych warunkach hodowlanych (37°C, 5% CO ₂). Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Incucyte® SX1 Live-Cell Analysis System (Sartorius) pozwalającym na jednoczesną inkubację i analizę mikroskopową. Skala 200 µm.	143
Rysunek 4.20.	Wpływ dodania roztworu acetaminofenu o stężeniu 10 mM oraz 50 mM na pomiar impedancji w pożywce hodowlanej.	144
Rysunek 4.21.	Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski), pomiarów EIS (kolor różowy) oraz pomiarów czujnika glukozy (kolor żółty) podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z roztworem acetaminofenu o stężeniu 1 mM.	146
Rysunek 4.22.	Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski), pomiarów EIS (kolor różowy) oraz pomiarów czujnika glukozy (kolor żółty) podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z roztworem acetaminofenu o stężeniu 10 mM.	147
Rysunek 4.23.	Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski), pomiarów EIS (kolor różowy) oraz pomiarów czujnika glukozy (kolor żółty) podczas 24h inkubacji komórek linii HepG2 z roztworem acetaminofenu o stężeniu 50 mM.	148

Rysunek 4.24.	Wpływ acetaminofenu na żywotność komórek linii HepG2 w układzie pomiarowym w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.	149
Rysunek 5.1.	Reakcja żelatyny i bezwodnika metakrylowego w celu substytucji grup podstawowych metakryloilowych. Modyfikacja zachodzi w grupach aminowych i hydroksylowych ^[11] .	156
Rysunek 5.2.	Schematyczne przedstawienie macierzy czujnikowej wykorzystanej w niniejszym rozdziale.	158
Rysunek 5.3.	Schematyczne przedstawienie form do utworzenia trójwymiarowych hodowli komórkowych: okrągłe formy silikonowe o średnicy 6 mm (A) oraz kwadratowych wytworzonych metodą druku 3D (B).	160
Rysunek 5.4.	Schemat przygotowania enkapsulacji zawiesiny komórkowej w matrycy hydrożelowej GelMa.	161
Rysunek 5.5.	Zdjęcie komory hodowlanej po usieciowaniu matrycy hydrożelowej na macierzy elektrodowej po dodaniu 200 μ l pożywki hodowlanej.	162
Rysunek 5.6.	Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ różnego stężenia matrycy hydrożelowej GelMa (7% oraz 10%) na aktywację genów reporterowych w badanych komórkach linii huCho, która nastąpiła w wyniku ograniczonej dyfuzji i metabolicznego zużycia tlenu po 24h i 48h inkubacji w pożywce hodowlanej. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi Z. Skala 2000 μ m.	164
Rysunek 5.7.	Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające wpływ gęstości zawiesiny komórkowej (3×10^6 komórek/ml oraz 4×10^6 komórek/ml) na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 7% na aktywację genów reporterowych, w wyniku ograniczonej dyfuzji i metabolicznego zużycia tlenu, w komórkach linii huCho po 72h inkubacji w pożywce hodowlanej. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi-Z. Skala 3000 μ m.	165

Rysunek 5.8.	Zdjęcia z obserwacji mikroskopowych przedstawiające uzyskany gradient stężeń tlenu poprzez dodatkowe szkiełko mikroskopowe o szerokości 6 mm w hodowli 3D w komórek linii huCho z wykorzystaniem zawiesiny komórkowej o gęstości 4×10^6 komórek/ml na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 6,5% po 72h inkubacji w pożywce hodowlanej. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi-Z. Skala 3000 μm .	166
Rysunek 5.9.	Odpowiedź czujników tlenowych zawieszonych w trójwymiarowej hodowli komórek linii huCho na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 6,5% po 48h oraz 72h inkubacji w pożywce hodowlanej. Pomiar prowadzony z wykorzystaniem mikroczytników tlenu (ibidi OPAL – Optical O2 Measurement System).	167
Rysunek 5.10.	Obserwacje mikroskopowe wzrostu komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Skala 2000 μm .	168
Rysunek 5.11.	Obserwacje mikroskopowe morfologii komórek linii HepG2 w hodowli 2D oraz 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Skala 1000 μm .	168
Rysunek 5.12.	Porównanie żywotności komórek linii HepG2 w standardowej hodowli 2D oraz w trójwymiarowej hodowli komórkowej na rusztowaniach hydrożelowych GelMa w odniesieniu do kontroli nietraktowanej związkiem.	169
Rysunek 5.13.	Barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM (kolor zielony – komórki żywe) oraz jodka propidyny (kolor czerwony - komórki martwe). Inkubacja z roztworem acetaminofenonu o stężeniach 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM oraz 50 mM. Skala 2000 μm .	171
Rysunek 5.14.	Odpowiedź elektrod dla pomiaru w dwóch różnych stężeniach tlenu (12,5% oraz 7%) w pożywce hodowlanej w obecności rusztowań hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Potencjał redukcji tlenu - 0,6 V.	173
Rysunek 5.15.	Ocena stabilności elektrod podczas pomiarów w hodowli 3D na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%. Szybkość zmian potencjału 100 mV/s	174
Rysunek 5.16.	Odpowiedź czujników tlenu w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O_2 , 5% CO_2) w hodowli komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa oraz kontroli (matryca	176

- hydrożelowa bez obecności komórek). Potencjał redukcji tlenu -0,6 V.
- Rysunek 5.17. Barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM (kolor zielony – komórki żywe) oraz jodkiem propidyny (kolor czerwony - komórki martwe). Inkubacja w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5%). Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi Z. Skala 3000 µm. 177
- Rysunek 5.18. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas 48h hodowli oraz 24h inkubacji komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%, z roztworem acetaminofenu o stężeniu 1 mM. 179
- Rysunek 5.19. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas 48h hodowli oraz 24h inkubacji komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%, z roztworem acetaminofenu o stężeniu 10 mM. 180
- Rysunek 5.20. Zestawienie wyników uzyskanych z czujnika tlenu (kolor niebieski) oraz pomiarów EIS (kolor różowy) podczas 48h hodowli oraz 24h inkubacji komórek linii HepG2 na rusztowaniach hydrożelowych GelMa o stężeniu 10%, z roztworem acetaminofenu o stężeniu 50 mM. 181
- Rysunek 5.21. Hodowla 3D komórek linii HepG2 na rusztowaniu hydrożelowym GelMa po dekonstrukcji całego układu pomiarowego. 182
- Rysunek 5.22. Barwienie różnicowe z wykorzystaniem kalceiny-AM (kolor zielony – komórki żywe) oraz jodkiem propidyny (kolor czerwony - komórki martwe). Inkubacja z roztworem acetaminofenu o stężeniu 1 mM, 10mM oraz 50 mM. Zdjęcia uzyskane na urządzeniu Cytation™ 5 Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) pozwalającym na analizę mikroskopową w osi Z. Skala 3000 µm. 183

Spis Tabel

Tabela 1.1.	Porównanie hodowli dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych	24
Tabela 5.1.	Właściwości wybranego hydrożelu GelMa A5	160