

Открытая технология мультиканальной биоимпедансной спектроскопии *in vitro*

© А.А. Абелит,¹ Н.А. Бойцова,¹ Н.А. Верлов,² Д.Д. Ступин¹

¹ Академический университет им. Ж.И. Алфёрова РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра „Курчатовский институт“,
188300 Гатчина, Ленинградская обл., Россия
e-mail: natab2002@yandex.ru

Поступило в Редакцию 2 марта 2026 г.

В окончательной редакции 10 июля 2026 г.

Принято к публикации 10 июля 2026 г.

Создана и апробирована открытая методика многоканальной регистрации биоимпедансных спектров, получаемых с помощью мультиэлектродных матриц *in vitro*. Предлагаемый подход основан на применении технологий 3D-печати для изготовления эргономического коннектора-холдера для мультиэлектродных матриц, а также на использовании герконового реле, которое, получая управляющие импульсы от ТПЛ-логики, способно без внесения искажений в измеряемые спектры эффективно коммутировать измерительную аппаратуру с различными электродами матрицы. Успешное тестирование разработанного метода регистрации биоимпедансных спектров на примере исследования процесса гибели клеток HeLa под действием детергента Тритон X100 продемонстрировало преимущества многоканальной записи биоимпедансных спектров перед классическим подходом на основе Cell Index нормализации.

Ключевые слова: импедансная спектроскопия, мультиэлектродные матрицы, 3D-печать, мультиканальные системы.

DOI: 10.61011/JTF.2026.11.63777.60-26

Введение

Биоэлектроника сегодня прочно занимает ведущие позиции в области решения прикладных задач биологии и медицины [1–6]. С ее помощью сегодня не только восстанавливаются утраченные функции организма человека, такие как зрение и слух, но и активно проводятся исследования, направленные на поиск новых методов лечения различных заболеваний, а также на разработку новых типов биосенсоров. В то же время высокая стоимость коммерческого биоэлектронного оборудования и широта спектра решаемых с его помощью задач, а также доступность таких приборостроительных технологий, как 3D-печать и радиоэлектронные конструкторы, побуждают ученых к созданию более дешевых самодельных аналогов биоэлектронных приборов. В частности, большой прогресс в данном направлении был достигнут в области биоимпедансных цитосенсоров [1].

Как правило, импедансные цитосенсоры представляют собой модифицированные чашки Петри с расположенным на дне массивом микроэлектродов, импеданс которых варьируется в зависимости от состояния расположенных на них клеток. При этом часто как в коммерческих, так лабораторных биоимпедансных цитосенсорах используются только два электрода — рабочий и референсный, что приводит к необходимости применения различных ухищрений для подавления паразитных вариаций свойств клеточной среды во время про-

ведения экспериментов. Например, благодаря прибору xCelligence широкое распространение получила техника нормирования импеданса под названием Cell Index, в которой изначальное значение импеданса электродов считается референсным, и относительно него отсчитываются значения импеданса во все последующие моменты времени [1]. В то же время, как следует из определения Cell Index, такая техника позволяет нивелировать только начальный разброс импеданса электродов, а, например, варьирование проводимости клеточной среды, вызванное добавлением в нее различных веществ, Cell Index-нормализация эффективно подавить не может. По этой причине возникает естественная необходимость в использовании дополнительных пустых (контрольных) электродов в устройстве биоимпедансных сенсоров для отслеживания изменений свойств клеточной среды. Для этой цели можно использовать, например, коммерческие мультиэлектродные матрицы (МЭМ), которые изначально предназначались для исследования электрофизиологической активности нейронов [5,6], и стоимость которых является, как правило, не самой высокой среди остальных узлов коммерческих биоимпедансных сенсоров, включая их измерительные звенья. Ранее мы уже рассматривали измерительную схему для регистрации биоимпеданса с помощью МЭМ [1,2]. В настоящей работе будет предложена техника многоканальной регистрации импеданса МЭМ с помощью дешевых и доступ-

ных на радиорынке компонент и с помощью оснастки, выполненной методами 3D-печати.

1. Материалы и методы

Для обеспечения многоканальной записи биоимпедансных данных требуется решить две задачи. Во-первых, необходимо обеспечить возможность механического подключения к определенным электродам МЭМ, а во-вторых, необходимо автоматизировать процесс измерения их импеданса. Для решения первой задачи нами был разработан универсальный холдер для МЭМ, который может быть легко изготовлен методами филаментной 3D-печати (stl-файлы доступны по ссылкам [7,8]). Для этой цели в настоящей работе мы использовали PLA-пластик (Guangzhou Zhiwen Technology, China) и 3D-принтер Flying Bear S1 (Zhejiang FlyingBear 3D Technology Co., Ltd, China). Предлагаемый холдер состоит из кронштейнов-коннекторов с прижимными контактами и основания, содержащего 20 креплений для данных кронштейнов, световое окно для микроскопического визуального контроля электродов, крепления для столика микроскопа и углубления для установки вибродвигателей, предназначенных для аккуратного перемещения клеточной среды в МЭМ (рис. 1, *a, b*).

После печати кронштейнов на 3D-принтере (рис. 1, *c*) в их консолях просверливались отверстия диаметром 0.7 mm для установки прижимного контакта (Perel Russia, Россия) и угловой вилки. При этом для усиления конструкции кронштейнов прижимной контакт и вилку сначала необходимо было наполовину утопить в консоль, после чего в место их контакта с консолью добавлялось небольшое количество суперклея (наружная (верхняя) поверхность металлических деталей сохранялась при этом чистой), и затем завершалась их установка в консоль. Для удобства пользования кронштейнами угловые вилки в них устанавливались под углом около 45° к консоли, что снизило риск перекрытия оптического изображения дна матрицы соединительными проводами. После застывания клея прижимной контакт и вилка соединялись вместе с помощью припаивания между ними smd-резистора с номиналом менее 1 Ω. После пайки полученный кронштейн остужался до комнатной температуры для предотвращения нежелательной деформации 3D-пластика. Применение угловых вилок вместо классических штыревых позволило уменьшить высоту конструкции холдера, что важно при работе с неинвертированными микроскопами, которые, как правило, применяются для микроскопической диагностики непрозрачных электродов МЭМ.

Основание холдера также изготавливалось с помощью методов 3D-печати, после чего в него монтировались гайки M2.5. После сборки холдера МЭМ матрицы устанавливаются на него сверху на световое окно, и затем к их контактным площадкам подключаются кронштейны, которые дополнительно к своим основным функциям

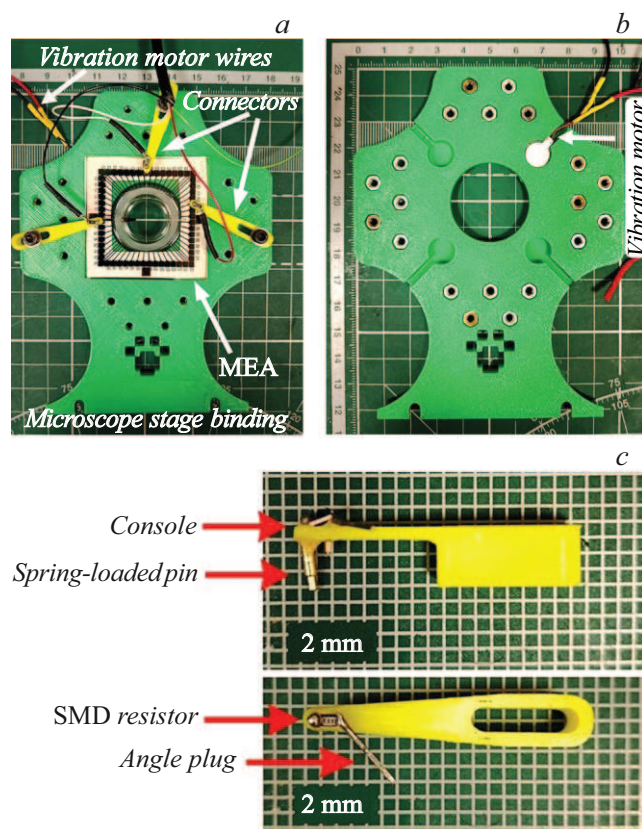


Рис. 1. Изготовленные холдер для МЭМ (*a* — вид сверху, *b* — вид снизу) и коннекторы для них (*c*).

фиксируют МЭМ на холдере. Для наглядного подключения к электродам под МЭМ устанавливается бумажная рамка с указанием номеров электродов согласно ее паспорту. Для установки МЭМ с нестандартным типоразмером, например, самодельных МЭМ, выполненных из предметного стекла, на поверхность МЭМ необходимо установить предварительно целое предметное стекло.

Решение второй задачи, очерченной в начале данного раздела, может быть получено с помощью применения типичных схемотехнических методов измерения нескольких сигналов посредством одного измерительного прибора, например, с использованием мультиплексоров [9], которые могут быть выполнены как в механических вариантах, так и с применением чисто электронных схем. При этом стоит отметить, что дешевые полупроводниковые мультиплексоры не позволяют эффективно коммутировать высокочастотные сигналы, которые необходимо использовать в биоимпедансной спектроскопии. В то же время надежные механические релейные переключатели требуют для своей работы протекания токов порядка 80–100 mA, что не может быть обеспечено простыми управляющими TTL выходами электронной логики. Тем не менее существует класс электромеханических приборов, которые могут переключаться десятиамиперными токами. Например, одним из таких приборов

является герконовое реле РЭС55 (Россия), которое и было использовано в настоящей работе. Данный прибор позволяет использовать логические выходы АЦП L-Card E20-10 (L-Card, Россия, ток короткого замыкания TTL выходов составляет 40 mA), который использовался нами также и для записи временных последовательностей зондирующего напряжения и токового отклика в биоимпедансных экспериментах. Благодаря быстрому времени переключения и отсутствию существенных паразитных емкостных утечек, РЭС55 позволяет проводить прецизионные измерения импеданса, что, вместе с описанным выше холдером, решает задачу многоканальной записи биоимпедансных спектров *in vitro*.

2. Результаты, экспериментальная апробация и обсуждения

Изготовленный холдер с установленной на него МЭМ представлен на рис. 1. Как видно из данного рисунка, предлагаемая конструкция позволяет свободно подключаться к любым трем электродам на МЭМ, формируя, таким образом, систему из измеряемого электрода с клетками, референсного (общего) электрода и контрольного (пустого) электрода. Наличие светового окна и интерфейса для присоединения к столику микроскопа позволяют исследовать клетки в МЭМ не только электрическими, но и оптически методами (данный дизайн холдера совместим со столиком флуоресцентного неинвертированного микроскопа Leica DM B 4000 (Leica, Германия), который был использован в описанном ниже биоэксперименте). Опционально устанавливаемый вибродвигатель позволяет перемещивать клеточную среду без прямого непосредственного контакта с ней, что снижает как риск перемещения МЭМ относительно объектива микроскопа, так и риск потери фокуса во время записи измерений.

Результаты тестирования такой многоканальной измерительной установки на примере биофизического эксперимента, направленного на исследование гибели клеток HeLa под действием детергента Тритон X100 (Sigma Aldrich, США), представлены на рис. 2. Импедансные спектры были получены с помощью МЭМ 60MEA200/30-iR-Ti (Multichannels systems, Германия) и импедансной спектроскопии на основе адаптивной фильтрации на установке, описанной в [1,2]. Как видно из полученных данных, после добавления детергента в клеточную среду модуль импеданса электрода, содержащего клетки, снизился. Данный эффект может возникать как за счет увеличения протекающего через покрытый электрод тока вследствие повреждения клеточных мембран детергентом, так и за счет изменения проводимости клеточной среды из-за его добавления. Такие сценарии на практике сложно различать при использовании только одного измеряемого электрода и Cell Index подхода. В то же время при

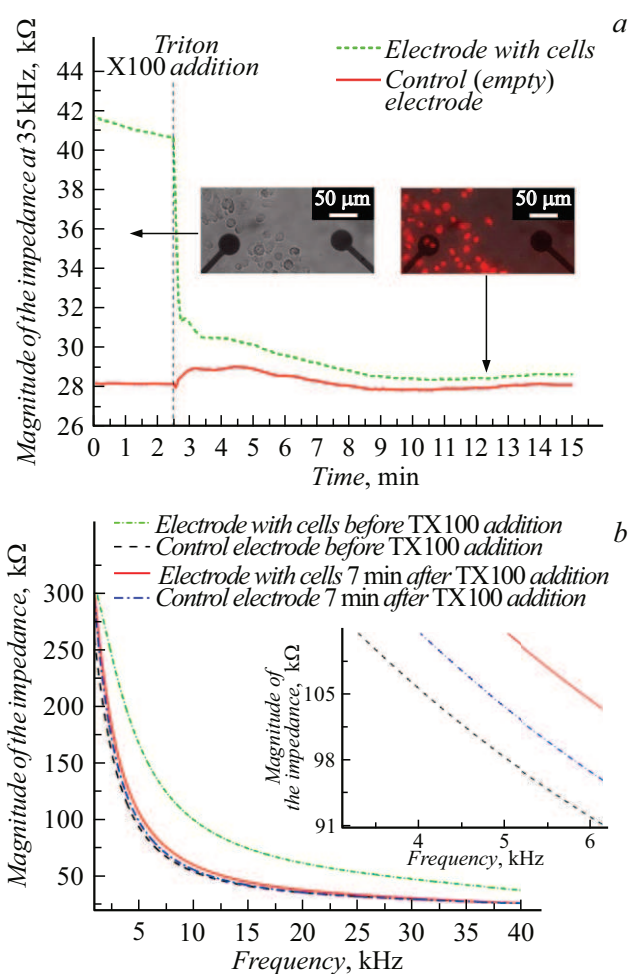


Рис. 2. Исследование гибели клеток HeLa с помощью мультиканальной биоимпедансной спектроскопии: *a* — эволюция импедансов пустого и покрытого клетками электродов МЭМ на частоте 35 kHz. Здесь слева на обеих фотографиях изображен покрытый клетками электрод, а справа — пустой, контрольный электрод; *b* — импедансные спектры данных электродов, измеренные до и после добавления детергента Тритон (TX100) в клеточную среду.

использовании двух электродов в измерительной схеме легко обнаружить, что импеданс контрольного электрода, наоборот, увеличивается при добавлении Тритон X100, что говорит о том, что падение импеданса покрытого клетками электрода вызвано действительно их гибелью, а не изменениями свойств клеточной среды.

Как следует из представленных графиков, добавление детергента привело к гибели клеток, о чем свидетельствует красное свечение иодистого пропидия, предварительно растворенного в клеточной среде. В то же время в поведении импедансов электродов наблюдается взаимно противоположная динамика — импеданс электрода с клетками падает, а импеданс контрольного электрода увеличивается, — что позволяет достоверно сопоставить резкое падение импеданса электрода,

покрытого клетками, именно с их гибелью, а не с изменениями проводимости клеточной среды за счет добавления Тритон X100.

3. Выводы и заключение

В ходе выполнения работы мы создали доступную экономически эффективную оснастку для многоканальной регистрации биоимпедансных данных *in vitro*. Полученная технология обеспечивает автоматическую регистрацию импеданса как покрытого клетками электрода, так и пустого контрольного электрода, находящегося в той же среде, и позволяет таким образом по разнице их импедансов нивелировать влияние изменения свойств клеточной среды во время проведения биофизических экспериментов. Преимущества применения на практике предлагаемой мультиканальной методики были наглядно продемонстрированы на примере исследования гибели клеток HeLa под действием детергента Тритон X100. Мы надеемся, что результаты работы позволят значительно упростить прототипирование новых видов биосенсоров и повысить их функционал, в результате чего будут решены актуальные задачи биологии и медицины.

Благодарности

Авторы выражают благодарность М.И. Блиновой, Н.А. Князеву, В.Б. Казанцеву и М.В. Дубине за всестороннюю помощь и поддержку.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание FSRM-2024-0001).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] D.D. Stupin, E.A. Kuzina, A.A. Abelit, A.K. Emelyanov, D.M. Nikolaev, M.N. Ryazantsev, S.V. Koniakhin, M.V. Dubina. ACS Biomater. Sci. Engineer., **7** (6), 1962 (2021).
- [2] D.D. Stupin, S.V. Koniakhin, N.A. Verlov, M.V. Dubina. Phys. Rev. Appl., **7** (5), 054024 (2017).
- [3] В.В. Нероев, Ю.С. Астахов, М.М. Лобанова, Д.Д. Ступин, Н.А. Верлов, М.Н. Рязанцев, О.В. Зайцева, А.А. Богданов, В.Н. Васильев, М.В. Дубина. Российский офтальмологический журнал, **11** (3), 3 (2018).
- [4] L. Garaeva, R. Kamyshinsky, Yu. Kil, E. Varfolomeeva, N. Verlov, E. Komarova, Yu. Garmay, S. Landa, V. Burdakov, A. Myasnikov, I.A. Vinnikov, B. Margulis, I. Guzhova, A. Kagansky, A.L. Konevega, T. Shtam. Sci. Rep., **11**, 6489 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-85833-y
- [5] A.Yu. Rotov, M.L. Firsov. J. Evolutionary Biochem. Physiol., **58** (6), 1675 (2022).
- [6] M. Bisio, A. Pimashkin, S. Buccelli, J. Tessadori, M. Semprini, T. Levi, I. Colombi, A. Gladkov, I. Mukhina, A. Aversa, V. Kazantsev, V. Pasquale, M. Chiappalone. Adv. Neurobiol., **22**, 351 (2019). DOI: 10.1007/978-3-030-11135-9_15
- [7] Электронный ресурс.
https://cults3d.com/en/3d-model/tool/mea_holder
- [8] Электронный ресурс.
https://cults3d.com/en/3d-model/tool/mea_connector
- [9] У. Титце, К. Шенк. Полупроводниковая схемотехника (Мир, М., 1982)