

Zweifach vernetzte supramolekulare Hydrogele für biomedizinische Sensoren

Margarita Günther¹, Maksim Rodin², Dirk Kuckling² und Gerald Gerlach¹

¹Institut für Festkörperelektronik, Technische Universität Dresden, 01062 Dresden/Deutschland

²Department Chemie, Universität Paderborn, 33098 Paderborn/Deutschland

Kontakt: margarita.guenther@tu-dresden.de

Einleitung

Ein schneller und unkomplizierter Nachweis spezifischer Biomarker in den Körperflüssigkeiten ermöglicht eine frühzeitige Diagnostik und entsprechende Behandlung bei schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs oder verminderter Nierenfunktion. Biomarker sind Substanzen, deren Anwesenheit und veränderte Konzentration auf Fehlfunktion des biologischen Systems bzw. eine Krankheit hindeuten. Die Entwicklung und Verbesserung von Analyseverfahren zur qualitativen und quantitativen Detektion der Biomarker nimmt in der nicht-invasiven Diagnostik eine wachsende Bedeutung ein.

Supramolekulare Hydrogelsysteme auf Wirt-Gast-Basis (W/G) sind zur spezifischen Detektion solcher Substanzen geeignet [1, 2]. Analyseverfahren, die supramolekulare Wechselwirkungen ausnutzen, zeichnen sich durch eine hohe Selektivität aus, da sie unspezifische Wechselwirkungen meist ausschließen. Allerdings basieren diese sehr häufig auf optischen Detektionsmethoden (z. B. Änderungen der Fluoreszenzemission entsprechender Chromophore oder plasmonischer Partikeln). Sensoren auf Hydrogel-Basis sind miniaturisierbar (schnelle Reaktionszeiten), integrierbar (durch Kombination mit anderen Sensoren Erhöhung der Selektivität und Sensitivität) und liefern ein elektrisches Ausgangssignal (einfache Datenerfassung, z. B. für die on-site-Diagnostik). In einem Mikrosensor führt die Quellungsveränderung eines „intelligenten“ Hydrogels (chemo-mechanischer Wandler) schließlich durch einen piezoresistiven Si-Drucksensorchip (mechano-elektrischer Wandler) zur einem Sensorsignal.

Beispielhaft werden in diesem Beitrag supramolekulare Wirt/Gast-Strukturen für den speziellen Biomarker Spermin betrachtet. Die Sensorkennlinien wurden vermessen und die Nachweisgrenze für Spermin bestimmt. Die möglichen Querempfindlichkeiten bezüglich der Stoffwechselprodukte wurden in physiologischen Konzentrationsbereichen detailliert untersucht.

Methoden und Materialien

Wirt- und Gast-Moleküle

Als Wirt-Moleküle wurden säulenförmige makrozyklische Pillar[5]arene verwendet, die strukturbedingt eine topologische Kavität (einen elektronenreichen

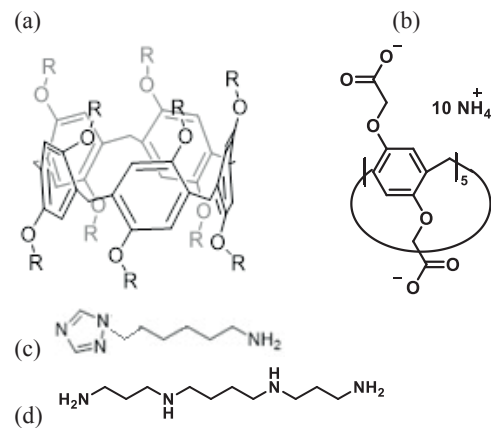


Abb. 1: Pillar[5]aren als Wirt-Molekül mit einer symmetrischen, säulenförmigen Struktur und einem elektronenreichen Hohlraum (a, b): 3D-Darstellung (a) und Struktur des wasserlöslichen Pillar[5]arens (b); Triazolylhexylamin als Gast-Molekül (c) und Analyt-Molekül Spermin (d).

Hohlraum) bilden (Abb. 1). Die Gast-Moleküle, hier Triazolylhexylamin (THA), dringen in diese Kavität ein und wechselwirken dort mit dem Wirt.

Die Art der Wechselwirkungen, die sich zwischen den beiden Spezies ausbilden, ist hierbei rein physikalisch und nicht kovalent und daher reversibel. Um eine substanzspezifische Reaktion des Gels mit W/G-Vernetzungen auszulösen, wird ein Analyt-Molekül (A) (Abb. 1d) zugeführt, welches ebenfalls mit dem Wirt in Wechselwirkung tritt und einen konkurrierenden W/A-Komplex bildet. Das ursprüngliche Gast-Molekül wird aus der Wirt-Kavität verdrängt. In Folge des Austauschs kommt es zum Bruch der Vernetzungen und damit zu einer Volumenvergrößerung. Die findet zusätzlich zur primären Quellung durch Einlagerung von Lösungsmittel statt.

Polymerstruktur

Für die Hydrogelherstellung wurde ein photovernetzbares Copolymer von Dimethylacrylamid (DMAAm) und Vinylidimethylazlacton (VDMA) (Abb. 2a) mit einem Photovernetzer Dimethylmaleimid (DMIAAm) (Abb. 2b) verwendet. Die VDMA-Einheiten werden mit Gast- und Photovernetzer-Einheiten modifiziert, woraus sich das Gast-Polymer PTHAP ergibt (Abb. 2c). Die Gast-Einheit von Triazolylhexylamin (THA)

ist über die freie Aminogruppe an das Polymernetzwerk angebunden und entspricht dem a-Teil in Abb. 2c.

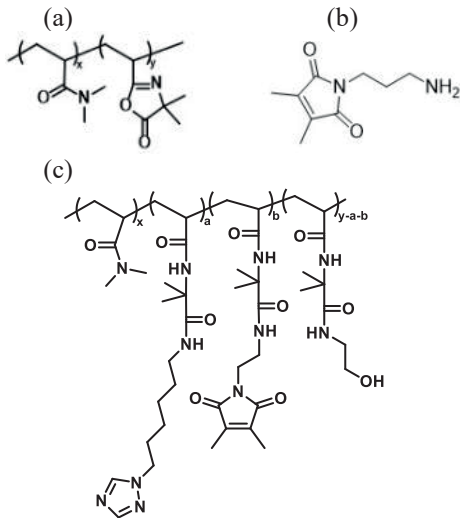


Abb. 2: Copolymer von Dimethylacrylamid (DMAAM, x-Teil) und Vinylidimethylazlacton (VDMA, y-Teil) (a), Photovernetzer Dimethylmaleimid (DMIAAm) (b) und Struktur des PTHAP-Polymernetzwerk mit einer Gast-Einheit von Triazolylhexylamin (THA): x-Teil: Dimethylacrylamid (DMAAM), a-Teil: Triazolylhexylamin (THA) als Gast-Einheit, b-Teil: Dimethylmaleimid (DMIAAm) als Photovernetzer, y-a-b-Teil: Einheiten, die während der Synthese durch die Öffnung der restlichen VDMA-Einheiten entstehen.

Aufbau des Sensors

Das PTHAP-Hydrogel wurde auf der Rückseite der 20 μm dicken Biegeplatte eines piezoresistiven Drucksensorchips (Abb. 3) aufgebracht, die vorher mit einer Haftvermittlerschicht versehen wurde, getrocknet und dann mittels UV-Bestrahlung (Intensität von 430 mW/cm^2 auf der Probenebene bei einer Wellenlänge von 365 nm) vernetzt.

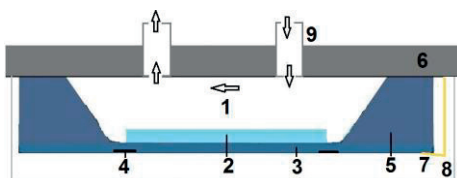


Abb. 3: Aufbau des piezoresistiven biochemischen Sensors mit einem quellfähigen Hydrogel in der Grube des Si-Drucksensorchips: 1 Messlösung; 2 quellfähiges Hydrogel; 3 Biegeplatte (3 mm x 3 mm x 0,02 mm), 4 mechano-elektrischer Wandler (piezoresistive Widerstandsbrücke); 5 Si-Chip (5 mm x 5 mm x 0,39 mm); 6 Substrat (Leiterplatte mit zwei Öffnungen); 7 Kontakt; 8 Kappe; 9 Kanüle

Die analytenabhängige Quellung des Gels führt zu einer Auslenkung der Biegeplatte und damit zu einer

mechanischen Verformung der in der Biegeplatte integrierten piezoresistiven Elemente. Dies bewirkt in den Piezowiderständen eine Widerstandsänderung und damit eine Änderung der elektrischen Ausgangsspannung U_{aus} des Sensors. Das Sensorsignal ist proportional zum Quellungsgrad des Hydrogels.

Messlösungen

Die Funktionalität des Sensors wurde in Spermin-Lösungen im Konzentrationsbereich von $1\text{-}10 \mu\text{M}$ getestet. Die Lösungen der Stoffwechselprodukte wurden in physiologischen Konzentrationsbereichen vorbereitet (Tab. 1).

Tab. 1: Physiologische Konzentrationsbereiche der Stoffwechselprodukte

Stoffwechselprodukt	Normalbereich	
	im Urin	im Blut
Harnstoff	166-485 mg/l 2,76-8,08 mmol/l	170-430 mg/l 2,83-7,16 mmol/l
Harnsäure	1,5-4,5 mmol/Tag max 4,76 mmol/Tag	30-70 mg/l 178-416,4 $\mu\text{mol/l}$
Kreatinin	0,39-2,59g/l (morgen) 3,45-22,9 mmol/l	8,1-14,4 mg/l 71,6- 27,3 $\mu\text{mol/l}$

Ergebnisse und Diskussion

Wie oben beschrieben, wird die Volumenänderung des Hydrogels bei Reaktion auf ein Analyt-Molekül mit Hilfe eines piezoresistiven Drucksensors in ein proportionales Sensorsignal gewandelt.

Abb.4 zeigt die Änderung der Ausgangsspannung des Sensors beim Wechsel zwischen 1 mM WSP5A-Lösung (water-soluble pillar[5]arene, WSP5A) und Spermin-Lösungen unterschiedlicher Konzentration c_{Spermin} .

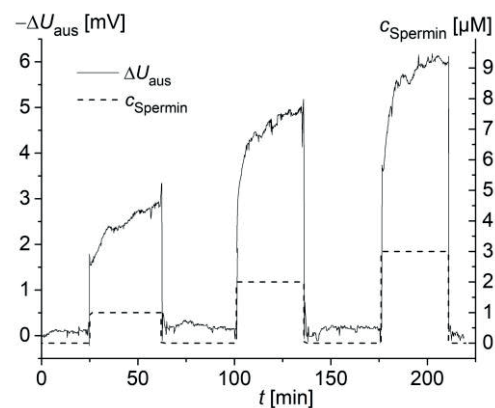


Abb. 4: Änderung der Ausgangsspannung des Sensors mit einer PTHAP-Hydrogelschicht auf der Rückseite der Biegeplatte des Si-Drucksensorchips beim Wechsel zwischen 1 mM WSP5A-Lösung und Spermin-Lösungen mit $1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$ und $3 \mu\text{M}$ Konzentration

Der WSP5A-Wirt komplexiert mit den 1,2,4-Triazol (THA)-Gastgruppen und verursacht als hochgeladenes Anion eine elektrostatische Abstoßung. In einer Spermin-Lösung wird der nicht-fixierte Wirt vom Gel-

gebundenen Gast verdrängt. In Folge der Veränderung der Polymerpolarität kommt es zur Volumenänderung des Gels und schließlich zur Änderung des Sensorsignals.

Die Kennlinie des Sensors (Abb. 5) wurde im Konzentrationsbereich von 1-10 μM Spermin vermessen und die Nachweisgrenze (Limit of Detection) als

$$x_{LoD} = k \frac{s_L}{p}$$

durch Kurvenanpassung zu 0,39 μM bestimmt [3]. Hier sind s_L die Standardabweichung des Sensorsignals in Analyt-freier Lösung, p der Anstieg der Kalibrierkurve und k der Faktor ($k = 3,3$ [4, 5]).

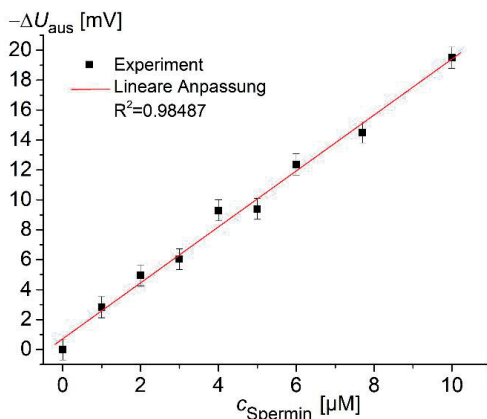


Abb. 5: Kennlinie des Sensors mit einer PTHAP-Hydrogelschicht auf der Rückseite der Biegeplatte des Si-Drucksensorchips in Spermin-Lösungen.

Abb.6 zeigt den Vergleich der Änderung der Ausgangsspannung des Sensors in Spermin-Lösungen und in Lösungen der Stoffwechselprodukte (Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin) in physiologischen Konzentrationsbereichen.

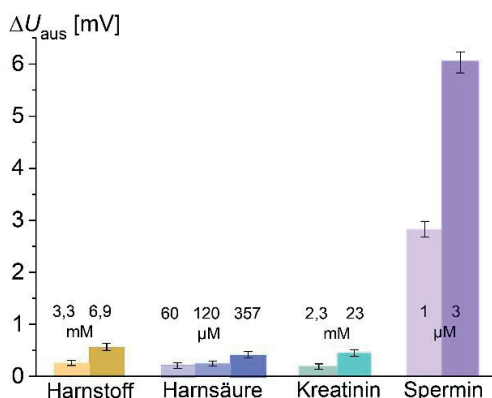


Abb. 6: Änderung ΔU_{aus} der Ausgangsspannung des Sensors mit einer PTHAP-Hydrogelschicht auf der Rückseite der Biegeplatte des Si-Drucksensorchips in Spermin-Lösungen und in Lösungen mit relevanten Stoffwechselprodukten (Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin) in physiologischen Konzentrationsbereichen

Zusammenfassung

In diesem Beitrag wurden Sensoren zum Nachweis von Biomarkern vorgestellt, die auf in Hydrogelen inkorporierten supramolekularen Wirt/Gast-Strukturen basieren. Ein solches Prinzip ermöglicht eine hohe Selektivität in Bezug auf die untersuchten Analyten. Durch den Vergleich der Messdaten eines Mess- mit einem Referenzsensor konnte die Genauigkeit und die Zuverlässigkeit des realisierten Sensors beispielhaft für die Detektion der Konzentration von Spermin-Lösungen bestimmt werden.

Literatur

- [1] LI, J. ; JI, C. ; YU, X. ; YIN, M. ; KUCKLING, D.: Dually cross-linked supramolecular hydrogel as surface plasmon resonance sensor for small molecule detection. In: *Macromol Rapid Commun* 40 (2019), Nr. 14, S. 1900189 (1-5).
- [2] LI, J. ; JI, C. ; LV, B. ; RODIN, M. ; PARADIES, J. ; YIN, M. ; KUCKLING, D.: Dually crosslinked supramolecular hydrogel for cancer biomarker sensing. In: *ACS Appl Mater Interfaces* 12 (2020), S. 36873-36881
- [3] DIN 32645:2008-11: Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung (Chemical analysis - Decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions - Terms, methods, evaluation)*, 2008.
- [4] *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Gold Book, Version 2.3.3, 2014, p. 839.
- [5] INCZEDY, J. ; LENGUEL T. ; URE, A. M.: Compendium of analytical nomenclature. Definitive rules. In: *The Orange Book*, 3rd edn. Blackwell Science, Oxford, 1998.

Danksagung

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung des Projektes „Zweifach vernetzte supramolekulare Hydrogele für Sensoranwendungen“ (Projektnummer: 501220359; GZ: GE 779/47-1 und KU 1280/16-1).