

Flexible Einweg-Sensorchips für das Zell Monitoring getestet mit lebenden Zellen

N. Mzoughi, M. Remm, B. Neumann, H. Grothe, B. Wolf
Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik,
Technische Universität München, Deutschland
grothe@tum.de

Abstract:

Multiparametrische Zell-Monitoring Sensor-Chips ermöglichen innerhalb weniger Tage patienten-individuelle in-vitro Chemosensitivitätstests an Biopsiematerial für eine effektive Tumorthherapie. Wir berichten über biegsame und kostengünstige Sensorchips die mittels Drucktechnologie auf Polymer-Substraten hergestellt werden können. Die Tauglichkeit der gedruckten Chips für Zellmessungen wird durch diverse Tests verifiziert. Die Eignung von innovativen SWCNT (single wall carbon nanotube) basierten pH- und Sauerstoff Sensoren für das Monitoring von Zell-Aktivität wird durch Messungen mit lebenden Hefezellen demonstriert.

Key words: gedruckte Elektronik, Einweg-Sensorchips, in-vitro Tumordiagnose, SWCNT-Sensoren .

Einleitung

Krebs ist eine der weltweit führenden Todesursachen und vor 1980 starben mehr als zwei Drittel aller Krebspatienten in Deutschland an ihrer Krebserkrankung [1]. Eine zuverlässige Frühdiagnose mittels effizienter Methoden, wie z.B. durch das Einsetzen von Sensorchips für eine personalisierte in-vitro Tumorthherapie [2,3] kann aber die Mortalitätsrate reduzieren. Fotolithographie und Dünnschichttechnologie als konventionelle Herstellungsmethoden für Sensorchips auf starren Substraten sind mit relativ hohen Herstellungskosten verbunden. Im Gegensatz dazu ist die gedruckte Elektronik eine additive Methode, die eine kostengünstige Herstellung großer Stückzahlen ermöglicht. Drucktechnologien sind für starre und flexible Substrate geeignet und eröffnen die Möglichkeit für innovative Anwendungen im medizinischen Bereich. Verschiedene Forschungsgruppen haben bereits über innovative flexible Sensoren wie z.B. nicht-invasive Sensoren für eine kontinuierliche Glukosemessung [4], Tatabasierende Laktat-Sensoren [5] und organische Pulsoxymetrie-Sensoren [6] berichtet. Am HNLME werden flexible Einweg-Sensorchips mittels Inkjetdruck auf Polymer substraten hergestellt und ihre Eignung für Zellmessungen untersucht. Die Herstellung von gedruckten Chips für biomedizinische Zwecke stellt eine Reihe von Anforderungen. Eine der wichtigsten Herausforderungen ist es, gute Leitfähigkeit und Haftung der Elektroden zu gewährleisten, ohne die empfindlichen Polymer substraten zu

schädigen. Für diesen Zweck wurden verschiedene Sintermethoden auf verschiedenen Polymersubstraten getestet und verglichen. Als Alternative zum klassischen thermischen Sintern wurden in den letzten Jahren mehrere Sintermethoden entwickelt, die schonender für empfindliche Substrate sind, wie z.B. chemisches Sintern [7], Plasma-Sintern [8] oder photonisches Sintern [9]. Die Lebensdauer der Elektroden in Zellkulturflüssigkeit unter angelegter Spannung soll für Zellmessungen geeignet sein. Außerdem müssen die Sensorchips biegsam und biokompatibel sein.

Materialien und Methoden

Für den Druckprozess wurde ein piezoelektrischer Drucker der Firma Microdrop (Microdrop Technologies, Norderstedt, Deutschland) verwendet, der mit einer AD-K-901 Inkjet-Düse ausgestattet ist. Als Substrat für die gedruckten Sensorchips wurden Polymerfolien (PET, PEN und PI) verwendet. Zum Drucken der IDES Zell-Elektroden wurde eine MWCNT/CNP-Tinte (multiwall carbon nanotubes/ carbon nanoparticles) der Firma Future Carbon (Future Carbon, Bayreuth, Deutschland) verwendet. Diese Tinte verliert sehr viel Material beim Filtrieren und wird deshalb 30 Minuten lang bei 4000 rpm zentrifugiert. Für die Herstellung der Kontaktflächen und Leiterbahnen wurde eine MOD (metal-organic decomposition) Tinte (Silbersalz in Xylo) und eine wässrige Silbernanopartikel-Tinte verwendet. Nach dem Drucken benötigen die Strukturen aus der MOD

Tinte eine Hydroquinone-Behandlung [10] um leitfähig zu werden. Dafür werden die Strukturen bei Raumtemperatur vier Minuten lang in eine Hydroquinone-Lösung eingetaucht. Die Inkjet-Tinten müssen über mehrere Monate stabil sein und sollen keine Klumpen enthalten, weil diese zur Verstopfung der Druck-Düse führen können. Um Agglomerationen zu vermeiden, werden die Nanopartikel in der Tinte mit einem Tensid oder Polymer ummantelt. Nach dem Drucken sind die Strukturen zunächst nicht leitfähig weil die Nanopartikel voneinander getrennt sind. Das Tensid muss entfernt werden, damit die Nanopartikel sich verbinden und leitfähige Pfade bilden können. Dieser Schritt wird als Sinterprozess bezeichnet. Chemisches Sintern [7] von Strukturen auf PET Substrat mit einer rauchenden HCl-Säure wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Dafür wurden die Strukturen 30 Sekunden lang über die Säure gehalten. Photonisches Sintern wurde in Kooperation mit der Firma Novacentrix (Novacentrix, Austin, U.S.A.) durchgeführt.

Zusätzlich zu den kostengünstig verfügbaren Polymer-Substraten, wie z.B. PET oder PC Folien, wurden in den letzten Jahren hochwertigere Substrate entwickelt, die nicht nur robuster und thermisch stabiler sind, sondern auch bessere optische Eigenschaften aufweisen. Wir hatten die Möglichkeit, farblose Polyimid-Folien der Firma I.S.T (I.S.T, Tokyo, Japan) und flexible Glassubstrate der Firma Schott (Schott, Mainz, Deutschland) als Substrate für gedruckte Biochips zu testen. Da diese Substrate relativ hohe Temperaturen aushalten können, wurde hier thermisches Sintern verwendet. Ein für Inkjet-Druck geeignetes Polymer von Altana wurde zum Abdecken der nicht biokompatiblen Silberleiterbahnen verwendet.

Zum Herstellen der SWCNT Sensoren wurde eine wässrige SWCNT/CMC Dispersion gemischt. Die sensitive SWCNT Schicht kann einfach mittels Dropcasting auf den Kohlenstoff-basierten Zellelektroden aufgebracht werden.

Ergebnisse

Kohlenstoff-basierte Elektroden

Kohlenstoffnanoröhrchen-basierte Elektrodenstrukturen sind zwar biokompatibel, weisen aber einen deutlich höheren Widerstand im Vergleich zu Silbernanopartikel-basierten Leiterbahnen auf. Der Widerstand der CNT-basierten Elektroden kann aber durch eine optimierte Vorbereitung der Tinte, die Erhöhung der Anzahl der Druckvorgänge und eine Säurenachbehandlung der gedruckten Struk-

turen [11] verringert werden. Die CNT/CNP Tinte muss vor dem Drucken zentrifugiert werden, um eine stabile Tropfenbildung zu gewährleisten. Je höher die Drehzahl beim Zentrifugieren ist, desto höher ist aber auch der Widerstand der gedruckten Leiterbahnen. Das Zentrifugieren der Tinte bei 4000 rpm für 30 Minuten erwies sich als ausreichend, um eine stabile Tropfenbildung zu erhalten. Der Widerstand der Leiterbahnen kann auch durch eine höhere Anzahl von Druckvorgängen erniedrigt werden, bei zehn Druckvorgängen wird der Widerstand etwa eine Größenordnung reduziert (Abb. 1). Nach dem Drucken lässt sich der Widerstand durch eine Säurebehandlung nochmals um den Faktor 2 verringern.

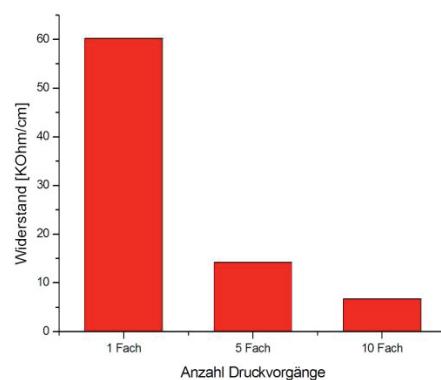


Abb. 1. Durch eine Erhöhung der Anzahl der Druckvorgänge kann der Widerstand der gedruckten CNT-Leiterbahnen um den Faktor 10 verringert werden.

Diese CNT-basierten Leiterbahnen weisen eine relativ gute Haftung zum Substrat auf. Für Leiterbahnen auf PI Substrat konnte eine Lebensdauer von bis zu 12 Wochen in wässriger Umgebung und bei einer angelegten Spannung von 300mV erreicht werden.

Silber-basierte Elektroden

Bei den Leiterbahnen aus der Silbersalz Tinte konnte ein Widerstand von 13 $\mu\Omega$.cm erreicht werden nach einer vierminütigen Behandlung mit einer Hydroquinone-Lösung (Abb. 2).

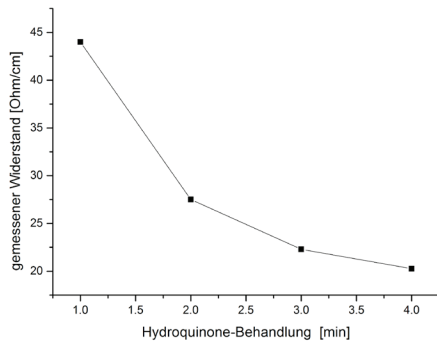


Abb. 2. Die Leiterbahnen aus Silbersalz müssen in eine Hydroquinone Lösung eingetaucht werden, um leitfähig zu werden. Eine Behandlungsdauer von vier Minuten führt zu einem relativ niedrigen Widerstand.

Bei den chemisch gesinterten Silbernanopartikel-basierten Leiterbahnen konnte ein Widerstand von $12 \mu\Omega\cdot\text{cm}$ gemessen werden. Diese Strukturen haben aber eine eher schlechte Haftung auf dem Substrat. Bei einem Tesafilm-Test werden die Leiterbahnen komplett zerstört. Deshalb wurde der Einfluss der Höhe und Breite der Leiterbahn auf ihre Lebensdauer in wässriger Umgebung untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Lebensdauer umso länger ist, je höher und breiter die Leiterbahn ist (Abb. 3).

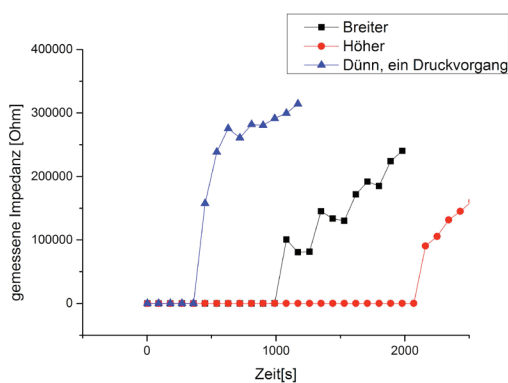


Abb. 3. Je höher und breiter die Leiterbahnen sind desto länger ist ihre Lebensdauer in wässriger Umgebung.

Obwohl die die Lebensdauer durch eine höhere Schichtdicke verbessert werden kann, ist die Lebensdauer der chemisch gesinterten Leiterbahnen aber noch nicht ausreichend für Zellmessungen.

Bei den photonisch gesinterten Leiterbahnen konnte ein Widerstand von $13 \mu\Omega\cdot\text{cm}$ gemessen werden. Im Gegensatz zu den chemisch gesinterten Leiterbahnen hatten die mit einem Lichtpuls gesinterten Leiterbahnen eine gute Haftung zum Substrat und es konnte eine Lebensdauer von bis zu elf Wochen in wässriger Umgebung erreicht werden.

Die farblose PI-Folien können Temperaturen bis zu 350°C aushalten. Nach thermischem Sintern im Trockenschrank für 60 Minuten konnte ein Widerstand von $3 \mu\Omega\cdot\text{cm}$ gemessen werden. Die Strukturen hatten auch eine gute Haftung zum Substrat. Beim Tesafilm-Test wurde eine Widerstandsänderung von maximal 1,6% gemessen. In wässriger Umgebung wurde eine Lebensdauer von bis zu sieben Wochen erreicht. Um den möglichen Einfluss einer weiteren Erhöhung der Temperatur bezüglich Leitfähigkeit und Haftung der Elektroden zu testen, wurden Silber- und CNT-Leiterbahnen auf Glassubstrat bei höheren Temperaturen behandelt. Es zeigt sich dabei, dass ab einer Temperatur von 475°C die CNT-Leiterbahnen ihre Leitfähigkeit verlieren und eine schlechtere Haftung zum Substrat aufweisen. Dasselbe Verhalten wurde für Silber-Leiterbahnen ab einer Temperatur von 525°C festgestellt. Bei 350°C hatten die Silber- und CNT-Elektroden eine gute Haftung zum Glassubstrat, ähnlich wie auf den PI-Folien.

Biegsamkeit

Mit Hilfe einer motorisierten Biegevorrichtung wurden Polymersubstrate mit aufgedruckten gesinterten Silber- und CNT-Elektroden mit einem Biegeradius von 1.5 cm und einer Zyklusdauer von 7 s gebogen. Nach 9400 Biegezyklen wurde keine Änderung in der Impedanz der Elektroden gemessen (Abb. 4).

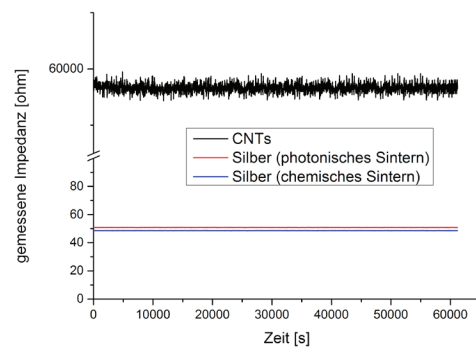


Abb. 4. Nach 9400 Biegezyklen sind keine Änderungen in der Impedanz der CNT- und Silber-Leiterbahnen zu sehen, die Elektroden sind biegsam.

Obwohl die chemisch gesinterten Leiterbahnen eine deutlich schlechtere Haftung zum Substrat zeigen, als die mit Lichtpuls behandelten Silber-Leiterbahnen, zeigen beide Strukturen beim Biegsamkeits-Test ein ähnliches Verhalten.

Biokompatibilität

Um die Eignung der verwendeten Materialien für Zellmessungen zu untersuchen wurden Biokompatibilitätstests gemäß ISO 10993 durchgeführt. Die verwendete Polymersubstrate PET

und PI, sowie die CNT/CNP Elektroden sind biokompatibel. Die Silberleiterbahnen sind hingegen erwartungsgemäß nicht biokompatibel, können aber mit einem biokompatiblen Polymer abgedeckt werden (Abb. 5).

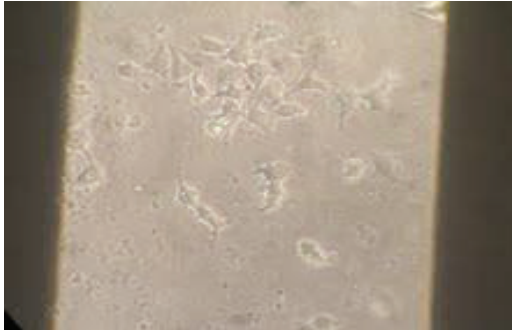


Abb. 5. Zellen können auf den mit einem biokompatiblen Polymer abgedeckten Silberleiterbahnen wachsen.

Die gedruckten Sensorchips sind somit biokompatibel und können für Zellmessungen eingesetzt werden.

Sensormessungen

Kohlenstoffnanoröhrchen haben interessante elektrische und optische Eigenschaften und werden deshalb für verschiedene Sensoranwendungen eingesetzt [12]. Wir haben die Eignung von überwiegend halbleitenden SWCNT-basierten Sensoren für pH- und Sauerstoff-Sensoren untersucht. Messungen in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten haben gezeigt, dass SWCNT-Sensoren pH-empfindlich sind. Die pH-Empfindlichkeit tritt am stärksten bei niedrigen Frequenzen auf (Abb. 6) [13].

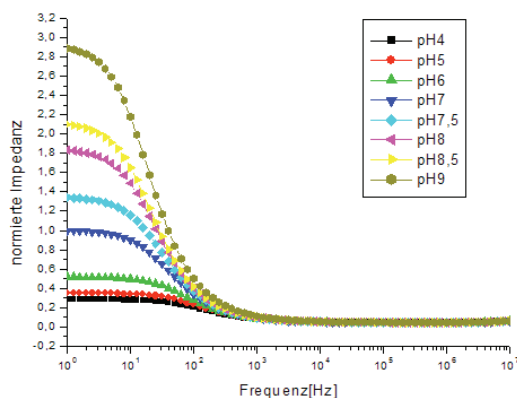


Abb. 6. Bei niedrigen Frequenzen zeigen halbleitende SWCNT-Sensoren eine deutliche pH-Empfindlichkeit.

Um die Eignung der SWCNT Sensoren für Sauerstoff Messungen zu untersuchen, wurde eine PBS-Lösung mit Stickstoff geblubbert, um den Sauerstoffgehalt möglichst gering zu

machen. Das PBS wurde dann auf den SWCNT-Sensor pipettiert. Sauerstoff diffundiert dann aus der Umgebung wieder ins PBS. Die Sauerstoffkonzentration steigt dadurch mit der Zeit an und sättigt sich schließlich. Die Impedanz der SWCNT-Schicht steigt damit ebenfalls an und stabilisiert sich wenn die Sauerstoffkonzentration 100% erreicht (Abb.7).

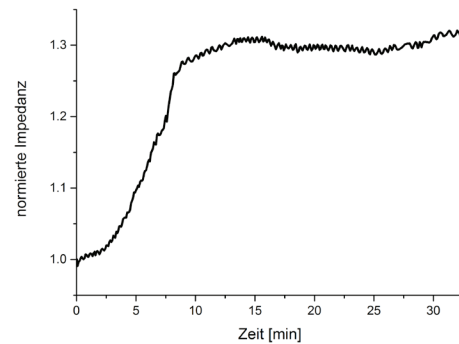


Abb. 7. Die Impedanz der SWCNT-Schicht steigt mit steigender Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit an und stabilisiert sich, wenn die Sauerstoffkonzentration die Sättigung erreicht.

Um die Querempfindlichkeit der Sensoren zu messen, wurden Lösungen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen hergestellt. Es wurde festgestellt dass die SWCNT Sensoren keine Querempfindlichkeit zu Glukose zeigen. Die maximale gemessene Impedanzänderung bei 1Hz lag bei ca. 1,9% (Abb. 8).

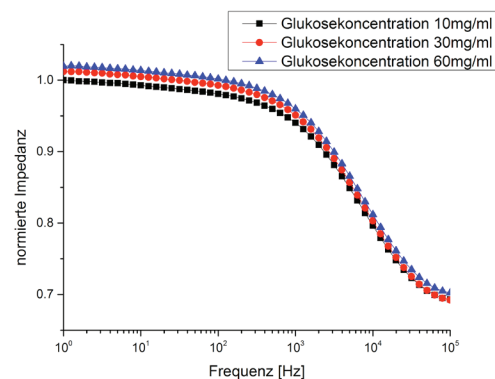


Abb. 8. Die SWCNT-Sensoren zeigen keine Glukoseempfindlichkeit.

Die SWCNT-Sensoren wurden dann mit Hefezellen getestet. Dafür wurden zunächst eine Referenzmessung mit reinem PBS und eine Referenzmessung mit PBS und toten Hefezellen (zuvor auf 150°C aufgeheizt) durchgeführt. Bei beiden Referenzmessungen wurde keine Änderung der Impedanz mit der Zeit festgestellt. Bei den Messungen mit lebenden Hefezellen konnte aber eine Änderung der Impedanz gemessen werden (Abb. 9).

Die Zugabe von Glukose führt zu einem erhöhten Metabolismus bei den Hefezellen. Da eine Glukoseempfindlichkeit des Sensors schon ausgeschlossen wurde, kann die beobachtete Impedanzänderung auf eine durch den Zellmetabolismus verursachte Ansäuerung des

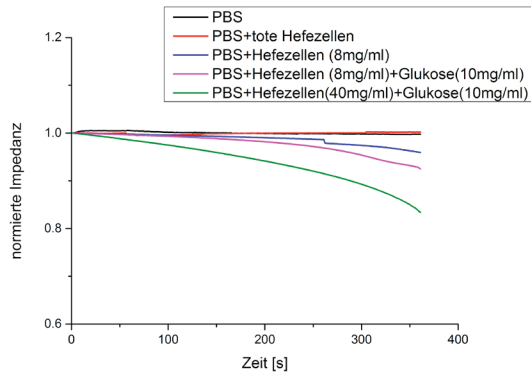


Abb. 9. Bei den Referenzmessungen (PBS und PBS + tote Hefezellen) wurde keine Änderung der Impedanz festgestellt, bei den Messungen mit lebenden Hefezellen aber ist eine deutliche Änderung der Impedanz zu sehen.

Zellmediums und den Sauerstoffverbrauch der Zellen zurückgeführt werden. Mit einer Hefesuspension mit einer Hefekonzentration von 40mg/ml und einer Glukosekonzentration von 10mg/ml konnte eine Änderung der Impedanz von 20% nach 5 Minuten gemessen werden.

Zusammenfassung

Die CNT-basierten Leiterbahnen haben zwar einen hohen Widerstand, der Widerstand kann aber durch mehrere Druckvorgänge und eine Säurebehandlung um den Faktor 20 verringert werden. Der Widerstand der Silberleiterbahnen konnte durch thermisches Sintern auf PI Folien oder flexible Glaschips auf $3 \mu\Omega\cdot\text{cm}$ verringert werden. Die Lebensdauer der Strukturen in wässriger Umgebung konnte auf bis zu 11 Wochen durch photonisches Sintern erhöht werden. Die gedruckten Sensorchips sind außerdem biegsam und biokompatibel und können für Zellmessungen eingesetzt werden. Die SWCNT-Sensoren sind pH- und Sauerstoffempfindlich und damit geeignet zur Detektion metabolischer Aktivität der untersuchten Zellen.

Danksagung

Die Mehrzahl der hier vorgestellten Ergebnisse entstanden im Rahmen des Verbundprojekts PRINTS (FKZ 16SV5393), gefördert vom BMBF. Besonderer Dank gilt auch der Fa. Novacentrix für die Durchführung des photonischen Sinterns an den von uns gedruckten Strukturen.

References

- [1] www.krebsinformationsdienst.de
- [2] R. Kleinahns, M. Brischwein, P. Wang, B. Becker, F. Demmel, T. Schwarzenberger, M. Zottmann, P. Wolf, A. Niendorf, B. Wolf, Sensor-based cell and tissue screening for personalized cancer chemotherapy, *Med Biol Eng Comput* (2012) 50:117–126
- [3] P. Wolf, M. Brischwein, R. Kleinahns, F. Demmel, T. Schwarzenberger, C. Pfister, B. Wolf, Automated platform for sensor-based monitoring and controlled Assays of living cells and tissues, *Biosensors and Bioelectronics* 50, 2013, 111–117
- [4] A. Bandodkar, W. Jia, C. Yardimci, X. Wang, J. Ramirez, J. Wang, Tattoo-Based Noninvasive Glucose Monitoring: A proof-of-Concept Study, *Analytical Chemistry*, 87, 2015, 394-398
- [5] W. Jia, A. Bandodkar, G. Valdés-Ramírez, J. Windmiller, Z. Yang, J. Ramírez, G. Chan, J. Wang, Electrochemical Tattoo Biosensors for Real-Time Noninvasive Lactate Monitoring in Human Perspiration, *Anal. Chem.* 2013, 85, 6553–6560
- [6] C. Lochner, Y. Khan, A. Pierre, A. Arias, All-organic optoelectronic sensor for pulse oximetry, *nature communications*, 2014
- [7] S. Magdassi, M. Grouchko, O. Berezin, A. Kamyshny, Triggering the Sintering of Silver Nanoparticles at Room Temperature, *ACS Nano*, 4, 2010, 1943–1948
- [8] I. Reinhold, C. Hendriks, R. Eckardt, J. Kranenburg, J. Perelaer, R. Baumann, U. Schubert, Argon plasma sintering of inkjet printed silver tracks on polymer substrates, *J. Mater. Chem.*, 2009, 19, 3384–3388
- [9] Y. Galagan, E. Coenen, R. Abbel, T. van Lammeren, S. Sabik, M. Barink, E. Meinders, R. Andriessen, P. Blom, Photonic sintering of inkjet printed current collecting grids for organic solar cell applications, *Organic Electronics*, 14, 2013, 38–46
- [10] J. Valetton, K. Hermans, C. Bastiaansen, D. Broer, J. Perelaer, U. Schubert, G. Crawford, P. Smith, Room temperature preparation of conductive silver features using spin-coating and inkjet printing, *J. Mater. Chem.*, 2010, 20, 543–546
- [11] H. Geng, K. Kim, K. So, Y. Lee, Y. Chang, Y. Lee, Effect of Acid Treatment on Carbon Nanotube-Based Flexible Transparent Conducting Films, *J. AM. CHEM. SOC.* 2007, 129, 7758-7759
- [12] J. Wang, Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review, *Electroanalysis*, 2005, 17
- [13] N. Mzoughi, A. Abdellah, Q. Gong, H. Grothe, P. Lugli, B. Wolf, G. Scarpa, Characterization of novel impedimetric pH-sensors based on solution-processable biocompatible thin-film semiconducting organic coatings, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172, 2012, 537-543