

Zellrasen-Adhäsions-Messungen an Dünnschicht-Impedanzstrukturen – 3Dcellsens

W. Fichtner¹, S. Päßler¹, M. Mertig¹, Th. Frank², I. Tobehn², A. Steinke²
¹KSI Meinsberg, Kurt-Schwabe-Straße 4, 04736 Waldheim,
 fichtner@ksi-meinsberg.de

²CiS Forschungsinstitut für Mikrosensorik und Photovoltaik, Konrad-Zuse-Straße 14, 99099 Erfurt

Zusammenfassung

Für eine quantitative Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einem Nährmedium werden histologische Methoden wie beispielsweise der MTT-Test eingesetzt. Nachteilig ist, dass dabei die Bewertung der Biokompatibilität erst nach dem Beenden einer Versuchsreihe möglich ist.

Das hier vorgestellte Verfahren erlaubt die Bewertung der Zellvitalität schon während der Versuchsdurchführung. Der Messaufbau besteht aus einem Dünnschicht-Sensor mit einer Auswerteelektronik und erfasst die Daten mittels Impedanzspektroskopie. Die elektrische Impedanz wird dabei von der Anzahl der Zellen auf der Oberfläche des Nährmediums maßgeblich beeinflusst. Für die Untersuchungen wurden Mausfibroblasten L929 als Modellzellen verwendet. Das Gefäßsystem wurde auf 37°C temperiert und mit 50 min⁻¹ geschüttelt, so dass eine Versorgung der Zellkultur auch ohne permanente Erneuerung der Nährlösung gewährleistet war. Abgestorbene Zellen werden aufgrund der vertikalen Bodenlage aus dem Zellrasen entfernt.

Die Messreihen mit verschiedenen Sensorexemplaren zeigten starke kontinuierliche Veränderungen der Impedanzwerte, die mit dem biologischen Zustand der Zellen korrelieren. Zur Ergänzung der Impedanzmessungen wurden digitale Fotoaufnahmen von mit Zellkultur L929 besiedelten Dünnschicht-Sensorstrukturen an einem Auflichtmikroskop und an einem Stereomikroskop durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der adhärennten lebenden Zellen (längliche Gestalt) im betrachteten Zeitraum stark abnimmt.

Schlagwörter:

Impedanzmessung, Dünnschicht-Sensorelement, Zellkultur, Mausfibroblasten, Zellvitalität

Motivation und Einleitung

Aus dem Verhalten bestimmter biologischer Zellkulturen auf verschiedene Umwelteinflüsse und Substanzen, kann auf toxische Wirkungen beim Menschen geschlossen werden. Eine wichtige Aufgabe ist die Bestimmung der Biokompatibilität von Werk- und Wirkstoffen zur Bestimmung der Gewebeverträglichkeit von Produkten, die im direkten Kontakt zur Körperoberfläche stehen.

Für eine quantitative Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einem Nährmedium dienen vor allem histologische Methoden. Bei diesen Verfahren werden die Zellpopulationen mit bestimmten zytochemischen Farbstoffen behandelt. Bekannt ist der MTT-Test, ein sogenannter Zytotoxizität-Test zum Nachweis der Zellvitalität.

Die Zellen werden *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazolium-

salz, behandelt, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen. Allerdings kann die Bewertung der Biokompatibilität erst nach dem Beenden einer Versuchsreihe erfolgen. Farbunterschiede erleichtern eine bessere Differenzierung lebender und toter Zellen bei den anschließenden Auszählungen.

Das vorgestellte Verfahren erlaubt die Bewertung der Zellvitalität schon während der Versuchsdurchführung. Das Messgerät besteht aus einem Sensor mit einer Auswerteelektronik und erfasst die Daten mittels Impedanzspektroskopie. Die elektrische Impedanz ist dabei proportional der Anzahl der Zellen auf der Oberfläche der Sensorstruktur. Die elektrische Messung bietet gegenüber den optischen Methoden die Vorteile der einfachen Parallelisierung, es ist kein Einsatz von Farbstoffen notwendig und eine zeitaufgelöste Beobachtung über die ge-

samte Messdauer ist möglich. Die Methode mittels Einfärben von Zellen ermöglicht im Gegensatz dazu nur Momentaufnahmen zum Zeitpunkt der Einfärbung.

Aufbau des Sensors

Die Basis des Sensors bildet eine Streufeldkapazität, welche durch eine Interdigitalstruktur, zwei ineinander greifende Kammelektroden, dargestellt wird. Als Elektrodenmaterial wurde Gold auf Glas verwendet. Die Elektrodenbreite beträgt $5\ \mu\text{m}$, der Spalt $7\ \mu\text{m}$, die Gesamtfläche ca. $1,6\ \text{mm}^2$. In Bild 1 ist das Prinzip dargestellt. Das entstehende Streufeld nimmt mit zunehmendem Abstand zur Elektrode ab.

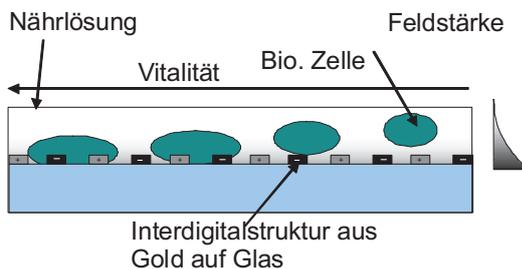


Bild 1: Prinzip und Aufbau des Sensors.

Der Einfluss auf das Messsignal der an der Sensoroberfläche haftenden Zellen ist wesentlich größer als das der abgelösten Zellen. Da sich die Zellen elektrisch von der Nährlösung unterscheiden, steht die Größe der Kolonie im Zusammenhang mit dem Ausgangssignal des Sensors.



Bild 2: Wellplatte mit integrierten Sensoren und Elektronik zur Signalauswertung.

Impedanzmessungen an Sensorelementen ohne Passivierungsschicht

Für die Untersuchungen wurden Mausfibroblasten L929 als Modellzellen verwendet. Diese werden in Kryoröhrchen bei $-80\ ^\circ\text{C}$ gelagert, so dass sie auch nach mehreren Monaten noch lebensfähig sind. Für die Versuche wurde die gewünschte Menge an Mausfibroblasten aufgetaut und eine quantitative Charakterisierung mittels Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Auf die Impedanzstrukturen wurde ein verschließbares Gefäß (Volumen ca. $1,4\ \text{ml}$) montiert, so dass die Ebene mit den Leitbahnen den Boden dieses Gefäßes bilden. Während der gesamten Dauer (ca. $50\ \text{h}$ bzw. $72\ \text{h}$) der Impedanzmessungen war das Gefäßsystem auf $37\ ^\circ\text{C}$ temperiert, mit $50\ \text{min}^{-1}$ geschüttelt und in vertikaler Bodenlage angeordnet (Bild 3). Abgestorbene Zellen werden permanent aus dem Zellrasen entfernt und die Anordnung der Impedanzstruktur ist gasblasenfrei. Damit wurde eine auch ohne kontinuierliche Erneuerung der Nährlösung eine für den Versuchszeitraum ausreichende Versorgung der Zellkultur erzielt. Das Bild 2 zeigt eine Wellplatte mit integrierter Elektrodenstruktur. Dabei sind je zwei benachbarte Wells fluidisch miteinander durch einen Überlaufkanal verbunden. Nur in einem Well ist eine Zellkolonie angesiedelt. Der zweite Sensor dient als Referenz und wertet nur die Änderung der verbrauchten Nährlösung aus.

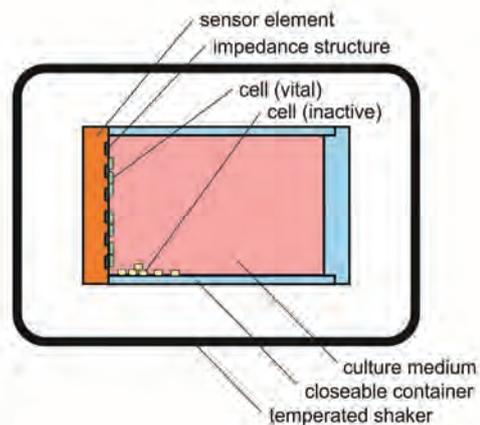


Bild 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Impedanzmessung von Sensorstrukturen ohne Passivierungsschicht.

Die Impedanzmessungen erfolgten mit einer RCL-Messbrücke FLUKE PM 6306 im Frequenzbereich von $100\ \text{Hz}$ bis $1\ \text{MHz}$.

Ergebnisse der Impedanzmessungen

Die Messreihen mit verschiedenen Sensor-exemplaren führten zu starken kontinuierlichen

Veränderungen der Impedanzwerte, die mit dem biologischen Zustand der Zellen korrelieren (Bild 4).

Hierbei wurden kontinuierliche Veränderungen über der gesamten Versuchsdauer beobachtet. Kapazität C und Phase ϕ steigen an, Betrag der Impedanz $|Z|$ und Widerstand R fallen in allen Frequenzbereichen ab, wobei bei 0,2 kHz der Abfall am stärksten ausgeprägt ist.

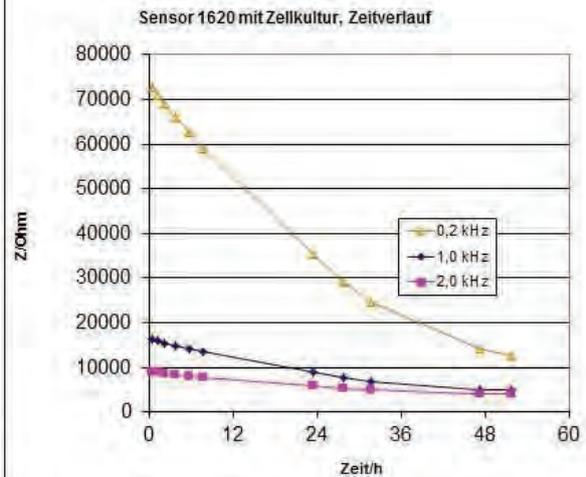
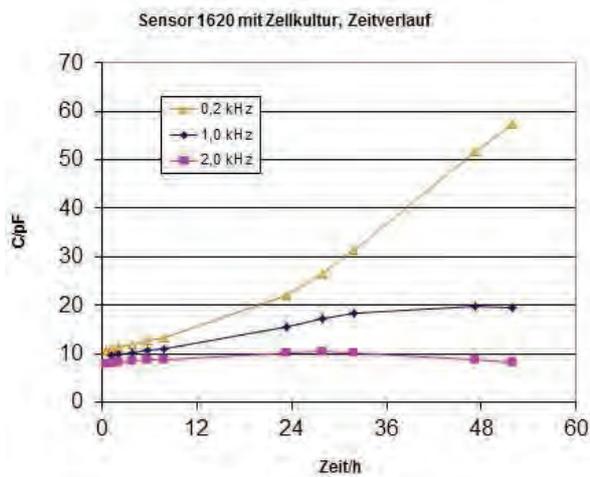


Bild 4: Zeitverläufe der Kapazität und Impedanzwerte bei diskreten Frequenzwerten von Sensorelement 16.20 in Nährlösung mit Zellkulturen.

Die Aufnahmen erfassen ein Bildfeld von 160 mm x 215 mm, was bei der gegebenen Vergrößerung einem Objektausschnitt von ca. 1,3 mm x 1,0 mm entspricht. Für die Zellzählung wurde daraus ein quadratisches Bildfeld von 83 mm x 83 mm (Objektausschnitt von 525 μm x 525 μm), das immer denselben Ort auf dem Objekt zeigt und damit bei genauer Betrachtung die Entwicklung der einzelnen

Zellen über den Zeitraum von 0h bis 4h nach Versuchsbeginn sichtbar macht. Weitere Aufnahmen bei 8h nach Versuchsbeginn wurden hier nicht berücksichtigt, da sich die Zellen nach dieser Zeit von ihrer Unterlage gelöst haben, aus der gemeinsamen Fokusebene mit der Impedanzstruktur herausbewegen und daher nicht ausreichend scharf abgebildet werden können.

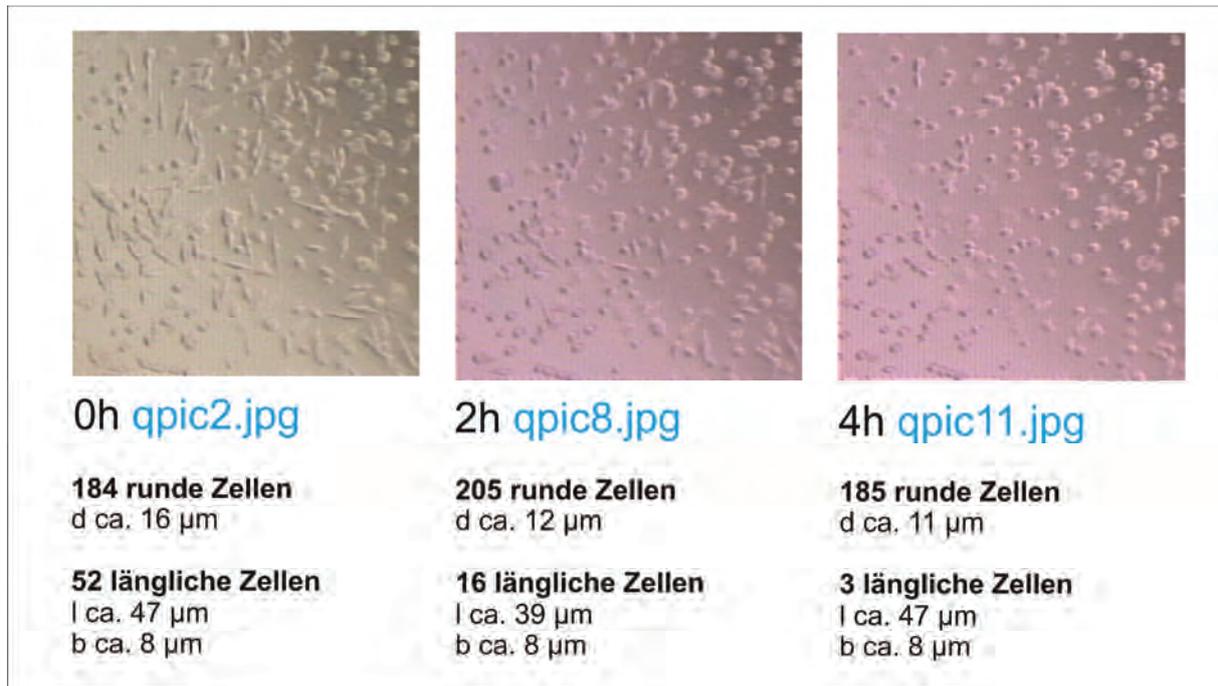


Bild 5: Zellzählung an Mikroskopaufnahmen (Objektausschnitt: 525 μm x 525 μm) von Zellkultur L929 nach Versuchsbeginn, 2h und 4h Versuchsdauer.

Die Ergebnisse der Zellzählung sind in Bild 5 vergleichend dargestellt. Es sind folgende Tendenzen ablesbar:

- Die Anzahl der adhärenenten lebenden Zellen (länglich) nimmt im betrachteten Zeitraum stark ab. Die betroffenen länglichen Zellen kontrahieren und nehmen eine zunehmend runde Gestalt an.
- Der Anteil der runden Zellen nimmt gegenüber den länglichen Zellen deutlich zu.
- Die Gesamtanzahl der Zellen nimmt langsam ab, vermutlich lösen sich im Versuchsverlauf runde Zellen von der Unterlage ab, verlassen die Fokusebene und werden nicht mehr abgebildet (Bild 5).

ne und werden nicht mehr abgebildet (Bild 5).

- Die absolute Anzahl der runden Zellen durchläuft ein Maximum, da bei fortschreitender Versuchsdauer die abgelösten und verschwindenden runden Zellen nicht ausreichend von lediglich ihre Gestalt ändernden (länglich zu rund) Zellen ersetzt werden (Bild 6).

Die Zeitverläufe der Zelldichte und der Zellanteile sind in den Diagrammen Bild 6 und 7 dargestellt.

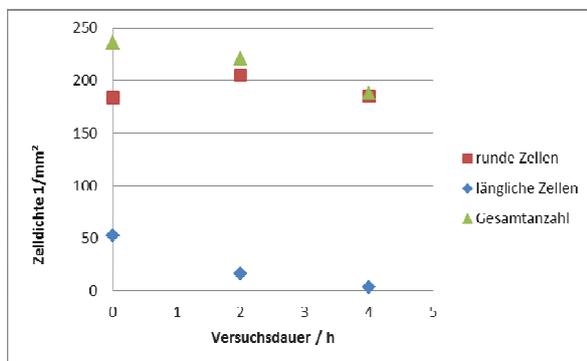


Bild 6: Diagramm der Zelldichte von L929 unterschiedlicher Gestalt.

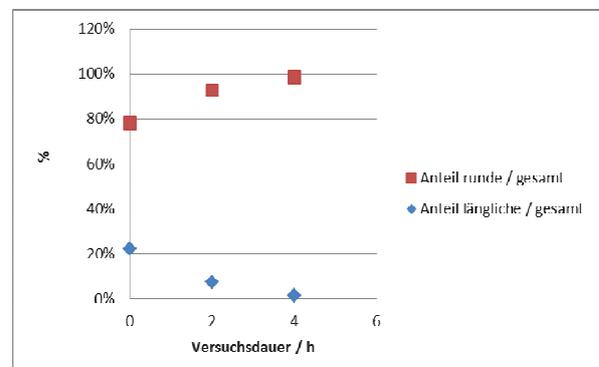


Bild 7: Diagramm der Zellanteile von L929 unterschiedlicher Gestalt.

Schlussfolgerungen

Einen Hinweis auf Veränderungen im biologischen System (abnehmende Vitalität bzw. abnehmende Anzahl lebender, adhärent wachsender Zellen) äußert sich in kontinuierlicher Veränderung der Impedanzwerte – begleitet von stetigem Verbrauch von NL und deren langsamer Eintrübung.

Die Zellaktivität äußert sich bei Sensorstrukturen geeigneter Leitbahngeometrien in einer starken Veränderung der Impedanzwerte während einer kurzen Anfangsphase (Absterben von Zellen, Anzahl der länglichen Zellen verringert sich) gefolgt von einem konstanten Impedanzwertverlauf (Zustand Zelltod ist erreicht, alle Zellen rund oder abgelöst).

Zwischen den zeitlichen Impedanzverläufen und den visuellen Beobachtungen des Mediums (Farbe, Trübung) bestehen starke Korrelationen.

Literatur

- [1] M. Brischwein, S. Herrmann, W. Vonau, F. Berthold, H. Grothe, E. R. Motrescu, B. Wolf: Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode structures, Lab Chip, 6 (2006), 819-822
- [2] J. Wegener, C. R. Keese, I. Giaever: Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces, Experimental Cell Research, 259 (2000), 158-166

Zur simultanen Ermittlung der Ergebnisse für die Zellzählung aus mikroskopischen Aufnahmen und der Impedanzmessung an Zellkulturen über einen längeren Zeitraum musste bislang ein Kompromiss eingegangen werden. Dieser betraf insbesondere die Kultivierungsbedingungen (Schüttler, Temperierung, Gasabschluss), so dass im betrachteten Projektzeitraum die Verbindung von den elektrischen Parametern mit den Ergebnissen aus der optischen Zellzählung an identischen Proben noch nicht realisiert werden konnte. Für die messtechnische Ermittlung der dielektrischen Parameter der Zellkörper L929 muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Ausrichtung der Sensorstruktur (vertikal oder horizontal) bei den Versuchen die gleiche ist.