

27 Mikropumpen sowie Sensoren für Adhäsion und Proliferation von Zellen in Lab-on-a-Chip Systemen

M. Stubbe, S. Bühler, W. Baumann, J. Gimsa

27.1 Einleitung

In den kommenden Jahren wird eine immer weiter fortschreitende Miniaturisierung von Lab-on-a-chip Systemen (El-Ali 2006) und μ TAS (Dardon 2001) für chemische, medizinische, biologische oder Umweltmonitoring Verfahren (z.B. cell monitoring, cell sorter, Mikrobioreaktoren) notwendig. Gründe dafür sind z.B. neue Richtlinien wie die Analyse der Toxizität bekannter und neuer Substanzen, geregelt durch die „Organisation of Economic Co-Operation and Development“ (OECD) und der EU in der „Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals“ (REACH) Verordnung. Die angestrebte Reduzierung der Anzahl von Versuchstieren verlangt dabei eine schnelle Weiterentwicklung und Miniaturisierung von *in-vitro* Analysesystemen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Mikrofluidik und der Miniaturisierung der Sensoren.

Für die Mikrofluidik ist eine präzise Handhabung von Volumen im Mikro- und Nanoliterbereich wichtig. Dies ermöglicht z.B. einen Einsatz in Bereichen der Einzelzellanalyse. Dieses Problem lässt sich durch die Integration von Mikropumpen in Mikrosysteme verringern. Ein Hauptproblem stellt hierbei die Entwicklung von Mikropumpen mit einer langen Lebensdauer und minimierten Verschleißerscheinungen dar (Stubbe 2007 und 2010, Holtappels 2009, Patente: Gimsa 2005, Holtappels 2006).

Zur Erfassung von physiologischen Parametern innerhalb von Mikrosystemen sind integrierte Sensoren notwendig, welche die Zellen in ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung möglichst nicht oder nur minimal beeinflussen. Gleichzeitig ist ein möglichst einfacher Aufbau anzustreben, da so die Zuverlässigkeit erhöht und die Produktionskosten der Systeme gesenkt werden können. Mögliche und bisher auch in kommerziellen Systemen genutzte Sensoren sind z.B. Sauerstoff- und pH-Sensoren sowie interdigitierende Elektrodenstrukturen (IDES) zur Messung der Adhäsion von Zellen auf der Oberfläche (Ceriotti 2007, Ehret 2001). Alle eingesetzten Sensoren sollten möglichst klein sein um die Zellen durch die Änderung der Oberflächenbeschaffenheit nicht zu beeinflussen. Weiterhin ist eine planare Bauweise von Vorteil, da so die in der Zellkultur verwendete morphologische und funktionelle Oberflächenbeschaffenheit imitiert werden kann.

In dieser Arbeit beschränken wir uns auf die Eigenschaften und Einsetzbarkeit unserer neuen elektro-thermalen Mikropumpen (ET μ P) und der IDEs. Beide Komponenten arbeiten mit elektrischen Wechselfeldern (AC). Bei den Mikropumpen wird das AC-Feld aktiv eingesetzt. Entlang eines Temperaturgradienten innerhalb eines Mediums wird durch ein AC-Feld ein Polarisationsgradient erzeugt. Daraus resultieren Coulomb- und dielektrische Kräfte die zusammen eine gerichtete Volumenkraft ergeben. Bei den IDEs wird das AC-Feld passiv zur Messung der Impedanz bzw. des kapazitiven Widerstandes zwischen zwei fingerförmigen Elektroden eingesetzt. Als Ersatzschaltbild für das Medium wurde ein Widerstand (R) parallel zu einem Kondensator (C) angenommen (RC-Model). Auf dem IDEs wachsende Zellen beeinflussen dessen Kapazität und somit ist es möglich Rückschlüsse auf das Zellwachstum zu ziehen.

27.2 Material und Methoden

27.2.1 Materialien und Fertigung

Ein wichtiger Punkt für den Aufbau der Mikrofluidik und Sensorsysteme für die Zellkultur ist die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Fertigung. Aus diesem Grund sind unsere Designs auf die Fertigung in photolithographischen Anlagen ausgelegt. Strukturgrößen bis hinunter zu 1 μ m sind hier problemlos möglich und geben einen großen Spielraum für die Dimensionierung von Sensoren.

Mikrofluidik- und Sensorsysteme werden auf einem Glassubstrat (thin glas 550 μ m) mit Platinbeschichtung (100 nm) photolithographisch herausgearbeitet. Als Passivierung werden z.B. SiO₂ oder Si₃N₄ in Dicken von 600 nm bis 1 μ m aufgebracht. Die zum Betrieb des Systems notwendigen Kanäle werden nachträglich aufgebracht und bestehen aus Photoresist oder Polydimethylsiloxan (PDMS) (Abb. 1).

Die Sensoren und Aktuatoren des Glaschips befinden sich innerhalb der Kanäle. In der aktuellen Version unseres Sensorchips, sind Mikropumpen, pH-, O₂-Sensoren und IDEs integriert.

27.2.2 Elektrothermale Mikropumpe (ET μ P)

Eine Übersicht über die verschiedenen Typen von zur Verfügung stehenden Mikropumpen zeigt Abb. 1. Die verschiedenen Pumptypen sind für mehrere Einsatzgebiete konzipiert und zeichnen sich durch unterschiedliches Pumpverhalten aus. In Abb. 1A und 1B sind jeweils eine indirekt und eine direkt geheizte Pumpe dargestellt. Diese zeichnen sich durch ein separat zu steuerndes Heizelement aus. Dadurch ist eine Regelung des effekti-

ven Temperaturgradienten weitgehend unabhängig vom Energieeintrag durch das elektrische Feld möglich, was zu einer Regulierung der Pumpgeschwindigkeit genutzt werden kann. Abb. 1C zeigt eine T-Kanal Pumpe. Hier wird der Temperaturgradient allein durch das elektrische Feld und die Leitfähigkeit des Mediums bestimmt. Die Pumprichtung weist aus dem mittleren Kanal heraus in zwei seitliche Kanäle hinein oder umgekehrt. Dieser Pumpotyp eignet sich vor allem um hohe Pumpgeschwindigkeiten zu erzielen. Der in Abb. 1D dargestellte Pumpotyp zeichnet sich dadurch aus, dass durch eine geeignete Trichterform ein Feldgradient erzeugt wird, welcher wiederum die Temperaturverteilung beeinflusst.

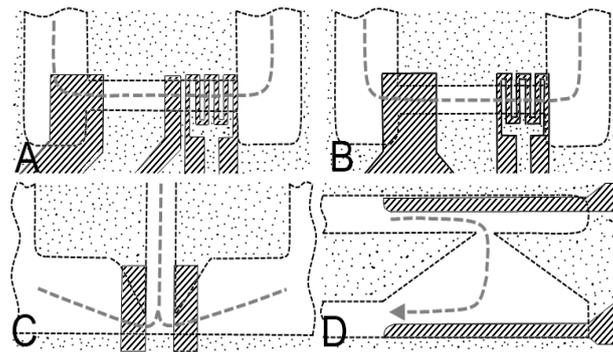


Abb. 1: Überblick über verschiedene Typen der ET μ P: (A: indirekt geheizte, B: direkt geheizte, C: T-Kanal, D: Trichter Pumpe). Die schraffierten Areale sind Platinstrukturen, die weißen und die gepunkteten Bereiche sind das Kanalvolumen und die Kanalwände. Die dicke gestrichelte Linie im Kanal zeigt die beobachteten Pumprichtungen (kein Pfeil bedeutet frequenzabhängige Umkehr der Pumprichtung)

Eine theoretische Beschreibung für die ET μ P zeigt Gleichung 1 (Stubbe 2007 und 2010, Holtappels 2009).

$$\langle \vec{F}_e \rangle = -\frac{1}{2} \left[\left(\frac{\nabla \sigma}{\sigma} - \frac{\nabla \epsilon}{\epsilon} \right) \cdot \vec{E}_0 \frac{\epsilon \vec{E}_0}{1 + (\omega \tau)^2} + \frac{1}{2} |E_0|^2 \nabla \epsilon \right] \quad \text{Gl. 1}$$

Die im Volumen des Mediums generierte Kraft F_e ist abhängig von den elektrischen (elektrische Leitfähigkeit σ) und dielektrischen (Permittivität ϵ) und dielektrischen (dielektrische Verlustfaktor $\tan \delta$) Eigenschaften des zu pumpenden Mediums. Diese lassen sich durch eine Änderung der Temperatur beeinflussen, wobei die Leitfähigkeit um 2%/K steigt und die Permittivität um 0,4%/K sinkt. Innerhalb der ET μ P erfolgt die Temperaturänderung entweder über eine Joulesche Erwärmung des Mediums durch das angelegte AC-Feld, ein separates Heizelement oder eine Kombination aus beiden. Weiterhin hängt die Volumenkraft von der Frequenz $\omega = 2 \pi f$ und dem Quadrat der elektrischen Feldstärke E_0 ab. Um die Abhängigkeit der im Volumen erzeugten Pumpkraft von den verschie-

denen Parametern zu zeigen, wurden Experimente mit der in Abb. 1B dargestellten, direkt geheizten Pumpe durchgeführt.

27.2.3 Interdigitierende Elektrodenstruktur (IDES)

Die IDES besteht aus zwei fingerförmigen Elektroden die ineinandergreifen und einen definierten Abstand haben. Für die Adhäsionsmessungen mit Zellen wurde die Kapazität (RC-Model) gemessen. Gemessen wurde in einem Frequenzbereich von 100 Hz bis 1 MHz (400 Messpunkte). Zunächst war eine Kalibrierung des Systems auf den Ausgangszustand ohne Zellen notwendig. Danach wurde im Abstand von einem Tag jeweils die Änderung der Kapazität, welche durch den Zellbewuchs hervorgerufen wurde, bestimmt.

27.3 Ergebnisse und Diskussion

27.3.1 Elektrothermale Mikropumpe (ET μ P)

Zur Charakterisierung der Mikropumpen wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Wie beschrieben, sind die wichtigsten Parameter für das Erzeugen einer Volumenkraft innerhalb der Pumpe die Temperaturdifferenz über dem elektrischen Feld und dessen Feldstärke. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse einer Finite-Elemente Simulation des Temperatur- und Feldverlaufs innerhalb der direkt geheizten ET μ P (Abb. 1B).

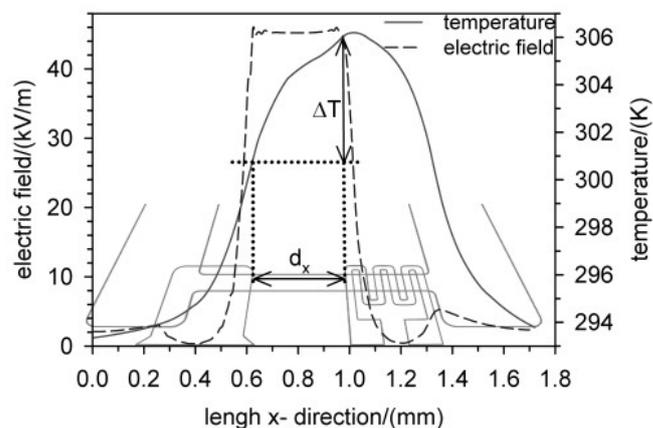


Abb. 2: Simulationsergebnisse der Temperatur- und Feldverteilung innerhalb einer in Abb. 1B dargestellten Mikropumpe. Ein wichtiger Parameter für die Berechnung der Pumpkraft ist die Temperaturdifferenz ΔT im Wirkungsbereich des T im Wirkungsbereich des Feldes. Die Heizleistung betrug 13 mW (2,1 V_{DC}), die Elektrodenspannung 20 V_{rms} und σ und dielektrische Permittivität = 0,9 S/m bei T

Bei diesem Pumptyp wird das Heizelement gleichzeitig als Masselektrode genutzt, was dazu führt, dass sich das Temperaturmaximum in etwa dort befindet, wo die elektrische Feldstärke auf Seite des Heizelements maximal wird. Dies bedeutet eine größtmögliche Temperaturdifferenz ΔT im Wirkungsbereich im Wirkungsbereich des elektrischen Feldes, was zu einer maximalen Krafterzeugung führt (vgl. Abb. 2).

Wie Gleichung 1 und Abb. 3 A zeigen, ist die Volumenkraft und somit auch die Pumpgeschwindigkeit abhängig von der Frequenz des angelegten AC-Feldes. Mit steigender Frequenz nimmt die Geschwindigkeit zu, bis sie bei einer bestimmten Frequenz abfällt. Abb. 3B zeigt die Abhängigkeit der Pumpgeschwindigkeit vom Quadrat der elektrischen Feldstärke (Elektrodenspannung) und Abb. 3C die fast lineare Abhängigkeit von der Heizleistung.

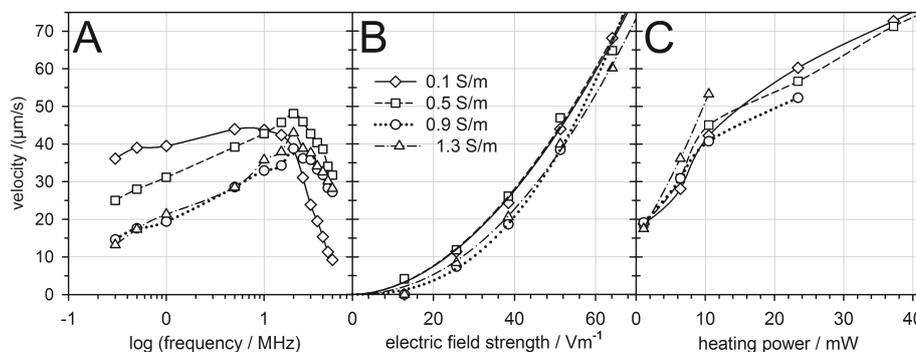


Abb. 3: Abhängigkeit der Pumpgeschwindigkeit für verschiedene Leitfähigkeiten einer direkt geheizten Pumpe von: (A) der Frequenz (Heizleistung 13 mW, AC-Feldstärke 51300 V/m), (B) der elektrischen Feldstärke (Heizleistung 13 mW, Frequenz 20 MHz), (C) der Heizleistung (AC-Feldstärke 51300 V/m, Frequenz 20 MHz). Es zeigt sich eine quadratische Abhängigkeit von der Feldstärke und eine annähernd lineare von der Heizleistung.

Wie diese Ergebnisse zeigen, lässt sich die Pumpgeschwindigkeit der ET μ P durch die Änderung verschiedener Parameter, wie z.B. der Frequenz, Heizleistung oder Elektrodenspannung, respektive der Feldstärke, beeinflussen.

27.3.2 Adhäsionsmessungen (IDES)

Wie eingangs beschrieben, ist die Adhäsion und Proliferation von Zellen ein oft genutzter Parameter zur Bestimmung der Zellvitalität. Die gängige Methode zur Bestimmung der Adhäsion der Zellen ist die Messung der Kapazität des IDES bei einer (oder mehreren) festen Frequenzen. Hier werden meist 10 kHz, selten 25 oder 50 kHz, verwendet. Bei unseren Experimenten hat sich jedoch gezeigt, dass für sich ändernde Bewuchsdichten

auf dem IDES eine Änderung der charakteristischen Bewuchsdichtenfrequenz (Maximum der Messkurven in Abb. 4A) zu verzeichnen ist. Eine Messung bei einer festen Frequenz führt so unweigerlich zu einer ungenauen Darstellung der Bewuchsdichte.

Abbildung 4A zeigt Messwerte der frequenzabhängigen Kapazitätsänderung für das *in-vitro* Wachstumsverhalten von murinen neuronalen Zellen über 15 Tage. Insgesamt wurde der Versuch dreimal mit je 8 Kulturchips wiederholt, wobei Versuch 1 lediglich 6 Tage lief. Die charakteristischen Frequenzen sind hier die Maxima, welche in Abb. 4B für jeden Versuch über den Tagen *in-vitro* aufgetragen sind. Die Punkte für jedes Experiment zeigen einen Verlauf der aus der Zellkultur bekannten Daten ähnelt. Um dies zu verifizieren wurden die Messpunkte für die Experimente 2 und 3 jeweils mit einer logistischen Gleichung nach Verhulst und Pearl für das exponentielle Wachstum von Populationen oder Zellkulturen (Gleichung 2) gefittet. K_0 und K_{\max} bezeichnen hier die minimale und maximale Kapazitätsänderung. Die Teilungszeit ist T und t die Zeit der Kultur *in-vitro*.

$$K(t) = \frac{K_0}{\frac{K_0}{K_{\max}} + \left(1 - \frac{K_0}{K_{\max}}\right) e^{\frac{\ln(2)t}{T}}} \quad \text{Gl. 2}$$

Wie in Abb. 4B zu sehen, ist der Verlauf der Kurven der drei Experimente sehr ähnlich. Die ermittelten Teilungszeiten für die murinen neuronalen Zellen liegen somit für Experiment 2 und 3 bei 31 und 34 Stunden mit Determinationskoeffizienten von $\bar{R}^2=99.1$ und 99.4 . Zuvor ermittelte Teilungszeiten für diese Zelltypen liegen zwischen 30 bis 36 Stunden. Bei weiteren Experimenten mit anderen Zelllinien, z.B. einer L929 Tumorzelllinie, lagen die gefitteten Teilungszeiten im Bereich der aus der klassischen Zellkultur (Daten des DSMZ) bekannten Werte von 21-24 Stunden.

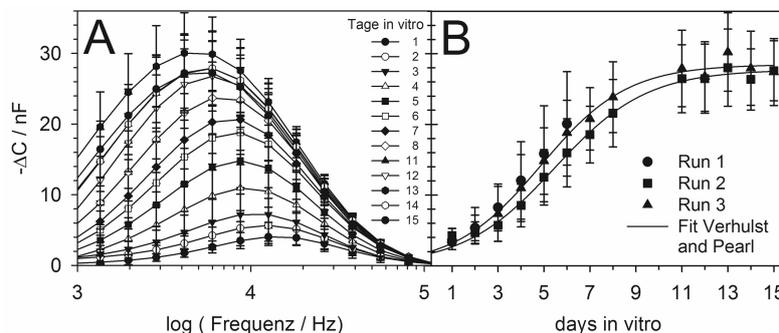


Abb. 4: A: Frequenzspektrum der Kapazität eines mit neuronalen Zellen bewachsenen IDES (Run 1) über 15 Tage. B: Maxima der Werte der Kapazität für 3 Durchläufe und gefittet mit einer logistischen Gleichung (Gl. 2) nach Verhulst und Pearl für das Wachstumsverhalten von Zellen.

27.4 Zusammenfassung

Mikrosysteme werden in Zukunft durch z.B. neue Richtlinien der Politik (REACH-Verordnung) immer wichtiger in unterschiedlichen Bereichen der Chemie, Biologie oder Medizin. Eine integrierte Mikrofluidik bringt hier Vorteile gegenüber herkömmlichen Systemen mit externer Fluidik, da die Mikrosysteme noch weiter verkleinert, die Zuverlässigkeit erhöht und die Produktionskosten reduziert werden können. Die ET μ P sind für die Integration in bestehende oder neue Mikrosysteme gut geeignet. Sie zeichnen sich durch eine einfache planare Bauweise ohne mechanische und bewegliche Teile sowie eine lange Haltbarkeit aus. Die Pumpgeschwindigkeit kann durch die Änderung weniger Einstellungen variiert werden. Dies gilt für Medien von sehr niedriger bis hin zu physiologischer elektrischer Leitfähigkeit und darüber hinaus. Eine Reduktion der Größe ist problemlos möglich und würde die ET μ P Effizienz erhöhen. Durch eine Kombination mehrerer Pumpen ist es zudem möglich höhere Drücke und größere Geschwindigkeiten zu erzielen.

Die planare Bauweise der IDEs ist bestens dazu geeignet die Adhäsionseigenschaften von Zellen an Oberflächen zu untersuchen. Eine planare Oberfläche ermöglicht es die Oberfläche morphologisch und funktionell zu verändern, wie z.B. Adhäsionsfaktoren aufzubringen. Durch das Messen der Kapazität über einen definierten Frequenzbereich ist es möglich, das Wachstum der Zellen mit Hilfe von bekannten logistischen Gleichungen (Verhulst & Pearl, Gl. 2) zu beschreiben und zellcharakteristische Daten, wie z.B. die Teilungszeit, zu ermitteln.

27.5 Referenzen

- Daridon A., Fascio V., Lichtenberg J., Wütrich R., Langen H., Verpoorte E. and F.N., de Rooij. Multi-layer microfluidic glass chips for microanalytical applications. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 261-269 (2001).
- El-Ali J., Sorger K., and Jensen K.F. Cells on Chip. *Nature* Volume 442, 403-411 (2006).
- Cerioti L., Kob A., Drechsler S., Ponti J., Thedinga E., Colpo P, Ehret R. and Rossi F. Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. *Analytical Biochemistry* 371, 92-104 (2007).

Ehret R., Baumann W., Brischwein M., Lehmann M., Henning T., Freund I., Drechsler S., Friedrich U., Hubert M.-L., Motrescu E., Kob A., Palzer H., and Wolf B. Multi-parametric cellular biosensor chips for screening applications. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 369, 30-35 (2001).

Gimsa J., Holtappels M., International patent application WO/2005/001286 (2005).

Holtappels M., Gimsa J., Stubbe M., International patent application WO/2007/098910 (2007).

Stubbe M., Holtappels M., Gimsa J., A new working principle of ac electro-hydrodynamic on-chip-micro-pumps. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40 6850 (2007).

Holtappels M., Stubbe M., Gimsa J., AC-field induced fluid-pumping in micro-systems with asymmetric temperature gradients. *Phys. Rev. E* 79 026309 (2009).

Stubbe M., Gimsa J., A short review on AC electro-thermal micropumps based on smeared structural polarizations in the presence of a temperature gradient. *Colloids Surf A: Physicochem. Eng. Aspects* *eingereicht* (2010).

15. Heiligenstädter Kolloquium

Heiligenstadt
27. 9. - 29. 9. 2010

Technische Systeme für die Lebenswissenschaften

Tagungsband

Institut für
Bioprocess- und
Analysenmesstechnik e.V.
Forschungseinrichtung des Freistaats Thüringen

