

Mikroimplantate mit Nadelelektroden und biodegradabler Schutzschicht

Stett A.¹, Herrmann T.¹, Held J.¹, Burkhardt C.¹, Möller A.², Boven K.-H.², Harscher A.³, Wrobel W.-G.³, Nisch W.¹

¹NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen, Reutlingen, Deutschland

²Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen

³Retina Implant AG, Reutlingen

stett@nmi.de

Kurzfassung

Für die Stimulation und Messung von Nervenzellaktivität mit Mikroimplantaten ist es vorteilhaft, Mikroelektroden möglichst in unmittelbare Nähe einzelner Nervenzellen im Gewebe zu bringen. Dadurch wird Stimulationseffizienz und die Ortsauflösung bei der Messung erhöht. Entsprechende Mikroimplantate werden hierzu mit nadelförmigen Elektroden mittels Mikrogalvanik versehen. Zum Schutz der feinen Elektroden wird das Implantat mit einer biodegradablen Schutzschicht aus p(DL-lactide-co-glycolide) überzogen, die sich nach der Implantation langsam auflöst. Dadurch gelangen die Spitzen der Elektroden in Kontakt mit dem Gewebe und können langsam in das Gewebe penetrieren.

1 Motivation

Für die Stimulation und Messung von Nervenzellaktivität mit Mikroimplantaten ist es vorteilhaft, Mikroelektroden möglichst in unmittelbare Nähe einzelner Nervenzellen zu bringen. Mit planaren Elektroden wie sie gegenwärtig bei Cochlea Implantaten, Retina Implantaten oder Hirnstammstimulatoren verwendet werden ist dies jedoch nicht möglich. Sie werden auf die Oberfläche von entsprechenden Nervenzellarealen aufgelegt mit entsprechend großem Abstand zu den in der Tiefe des Gewebes liegenden Nervenzellen. Dies hat eine reduzierte Ortsauflösung sowohl bei der Stimulation als auch bei der Ableitung bei Anwendungen wie z.B. Brain Computer Interfaces zur Folge. Im Falle der Stimulation bedeutet dies auch eine erhöhte Stimulationsschwelle mit entsprechend stärkerer Belastung der Elektroden/Gewebe-Grenzfläche. Idealerweise hätten die Elektroden die Form verzweigter Fortsätze von Nervenzellen (Dendriten) und könnten auf Grund ihrer mikroskaligen Struktur und nanoskaligen Oberfläche im Gewebe in unmittelbare Nähe von Zellen platziert werden. Das vom BMBF geförderte Projekt „Nanodendroden“ adressiert Verfahren zur Herstellung und Implantation solcher Elektroden sowie deren Integration in ein Mikroimplant.

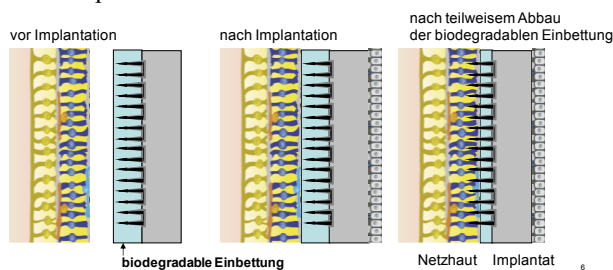


Abb. 1: Nadelelektroden-Array mit biodegradabler Schutzschicht. Nach Kontakt mit Gewebe (hier: Netzhaute) löst sich die Schicht langsam auf und die Nadelelektroden dringen langsam in das Gewebe ein (rechts).

Wir entwickeln Mikroimplantate mit nadelförmigen Elektroden. Zum Schutz der feinen Elektroden und des Gewebes während der Implantation wird das Implantat mit einer biodegradablen Schutzschicht überzogen, die sich nach der Implantation langsam auflöst (Abb. 1). Dadurch gelangen die Spitzen der Elektroden in Kontakt mit dem Gewebe und können langsam in das Gewebe penetrieren.

2 Herstellung von Nadelelektroden

Zur Herstellung von Elektrodenarrays mit Säulen- und Nadelelektroden wurde ein elektrochemisches Abscheideverfahren entwickelt (Abb. 2). Die ersten Schritte sind identisch mit der Herstellung von planaren Mikroelektroden-Arrays (Abb. 2A). Die Herstellung der Mikrosäule startet mit dem Sputtern der Starterschicht für die Galvanik (Abb. 2B). Anschließend erfolgt ein Lithographieschritt mit dem AZ@40XT-11D Fotolack von AZ Electronic Materials (Abb. 2C). Dabei wird eine Lackschicht der Dicke 60µm mit nur einem einzigen Aufschleuderschritt erzeugt. In diesem Lack werden Löcher mit einem Durchmesser von etwa 30 µm realisiert. Die Löcher dienen als Form für den nächsten Schritt, in dem ca. 50 µm hohe Goldsäulen galvanisiert werden (Abb. 2D). Nach der Galvanik werden der Fotolack und die Starterschicht entfernt.

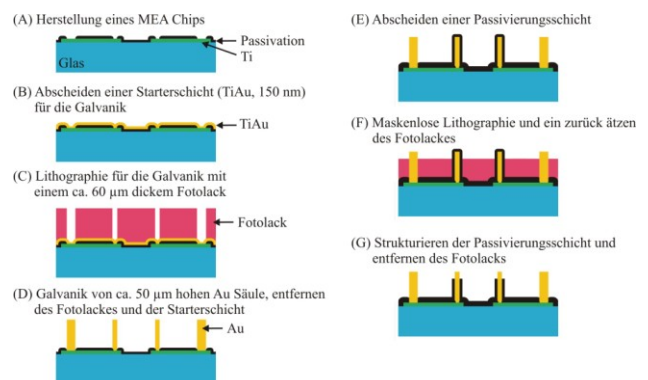


Abb. 2: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Nadelelektroden.

Als nächstes wird durch Sputtern von SiN eine Passivierungsschicht abgeschieden (Abb. 2E). Da die Nadeln zur elektrischen Gewebestimulation verwendet werden sollen muss das Metall an der Nadelspitze freigelegt werden. Dies wird durch eine maskenlose Lithographie und zurückätzen des Fotolackes realisiert (Abb. 2F). Der Freilegungsprozess ist in der Literatur beschrieben [1, 2]. Das freigelegte SiN wird trocken chemisch geätzt. Im letzten Schritt wird der Fotolack entfernt.

In Abb. 3 ist eine rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme einer Au-Mikrosäule nach der Galvanik und dem Entfernen des Fotolackes zu sehen. Mit der hier beschriebenen galvanischen Abscheidung von Au Säulen wurden bislang säulenförmige Elektroden mit einer Höhe von ca. 50 µm und einem Basisdurchmesser von etwa 30 µm erreicht. Die weiteren Entwicklungen zielen auf Säulen mit geringerem Durchmesser und mit nadelförmiger Spitze ab, um die Gewebepenetration zu erleichtern.

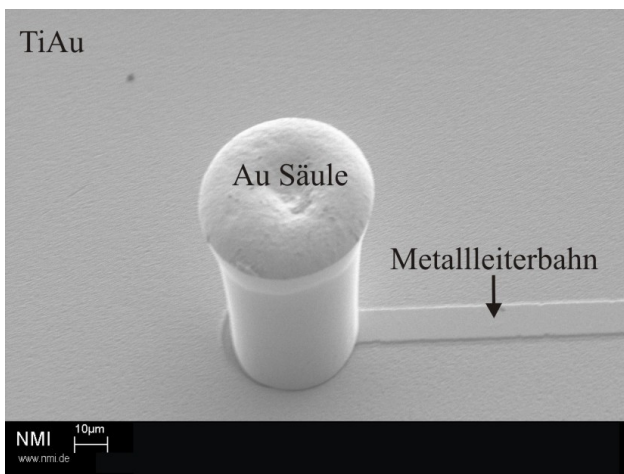


Abb. 3: REM Aufnahme einer Au Säule nach der Galvanik und dem Entfernen des Fotolackes.

3 Einbettung von Elektrodenarrays in biodegradable Schichten

Zum Schutz der Elektroden und des Gewebes während der Implantation werden die dreidimensionalen Elektrodenstrukturen vor der Implantation in eine Schicht aus bioabbaubarem Polymer eingebettet werden. Während des Schichtabbaus sollen die Elektrodenenden kontrolliert langsam und schonend in das Zellgewebe eindringen [3].

Um Abbauraten im Bereich von Wochen bis wenigen Monaten zu erreichen eignet sich die Verwendung des Copolymers p(DL-lactide-co-glycolide) [50:50]. Das gelöste Copolymer wurde mittels PDMS-Schattenmasken und einem Sprühbelacker (EVG 101) auf Testsubstrate aufgebracht. Um eine Gesamtschichtdicke von 50µm zu erreichen, wurden 5 Schichten der Dicke 10µm auf ein Substrat aufgetragen. Das Ausbacken der einzelnen Schichten erfolgte auf einer Heizplatte bei 100°C. Die Schichtprofile wurden anschließend mit einem digitalen 3D-Laserscanning Mikroskop (Keyence VK9700) vermessen (Abb. 4).

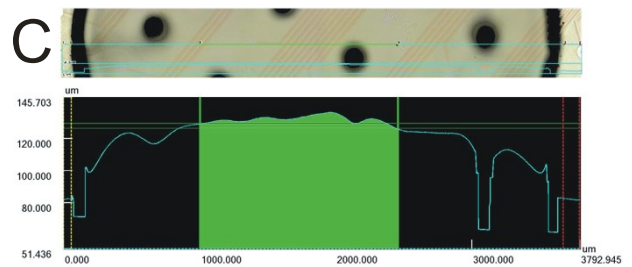
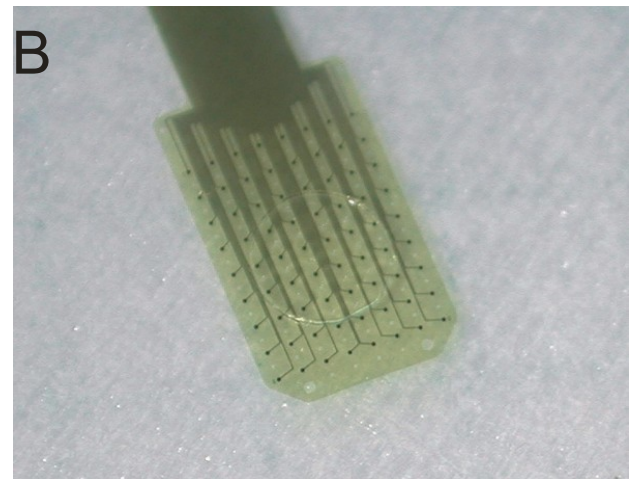


Abb. 4: Biodegradable Schichten auf Tests substraten: Flexibles Polyimid-Elektrodenarray (Flex-MEA) mit Schattenmaske während Belackungsprozess (A), Polymer-Schicht auf Flex-MEA (B.) und gemessenes Schichtprofil (C).

Die Charakterisierung des Abbauverhaltens der biodegradablen Polymerschichten und das Eindringen der 3D-Elektroden in Gewebeschichten soll in vitro mit Hirnschnitt-Kulturen erfolgen. Die quantitative Darstellung des Abbaus wird dadurch erschwert, dass sowohl Hirnschnitte als auch die Polymerschicht nahezu transparent sind.

Dies führte zu dem Ansatz nicht die Schicht selbst, sondern der Schicht zugeführte Sonden sichtbar zu machen. Dazu wurde eine 2%-Lösung von fluoreszenzmarkierten Latexbeads (molecular probes, $d = 0.5\mu\text{m}$, $\lambda_F = 505\text{nm}$) 250fach in PBS verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde auf ein mit Polymer beschichtetes Glassubstrat aufgetropft. Nach Verdunstung der Flüssigkeit konnten die anhaftenden Beads an einem Zeiss-Mikroskop unter Verwendung der Einstellungen für GFP-Fluoreszenz abgebildet werden. Eine quasi-konfokale Bildaufnahme mit einem Apotome-Modul ermöglichte in Kombination mit dem z-Stapel Mo-

das eine Aufnahme von optischen Schnitten die zu einem 3D-Bild zusammengefügt werden konnten (Abb. 5). Mit diesem Verfahren lassen sich nun die Schichtdicken in Abhängigkeit von der Kulturdauer bestimmen.

Das Projekt wird vom BMBF im Rahmen der Förderaktivität Nanobiotechnologie gefördert (FKZ 0312035, Projektträger Jülich)

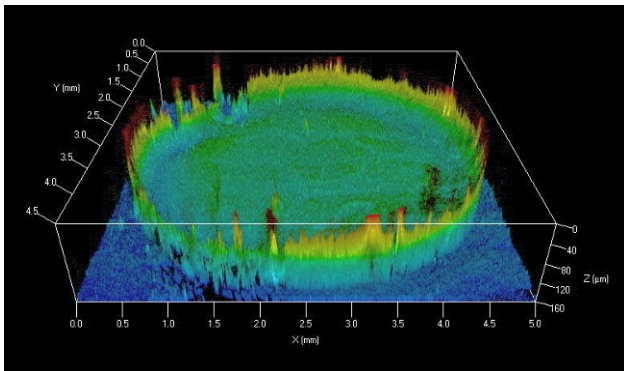


Abb. 5: Fluoreszenzaufnahme einer Polymerschicht auf Glassubstrat nach Behaftung mit fluoreszenzmarkierten Latexbeads.

4 Mikroimplantate

Für tierexperimentelle Untersuchungen der Langzeitstabilität werden die Nadelelektroden auf ein flexibles Polyimid-Leiterbändchen aufgebracht. Für die dauerhafte Stimulation in vivo wird das Array fest mit einem 32-Kanal-Stimulator verbunden. Zur Überwachung der Elektroden/Gewebe-Grenzfläche sind Impedanzmessungen möglich. Der auf einer 30x20 mm² großen Platine aufgebaute Stimulator mit D/A Wandler und Mikrokontroller besitzt eine bidirektionale IR-Schnittstelle für den drahtlosen Datenaustausch. Die Energieversorgung erfolgt mittels HF-Übertragung. Das Implantat wird ohne starres Gehäuse verkapselt und implantiert. In einer zweiten Variante werden die Nadelelektroden auf einen Si-Chip (3x3 mm²) aufgebracht, eingebettet und subretinal in Kaninchen implantiert um den Abbau der biodegradablen Schicht und das Einwachsen der Nadelelektroden in die Netzhaut zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die entwickelten und angestrebten Ergebnisse ermöglichen das schonende Eindringen von komplexen 3D-Elektrodenstrukturen in neuronales Gewebe.

6 Literatur

- [1] Held J. et al., "Hollow Microneedle Electrode Arrays for Intracellular Recording Applications," in Tech. Digest IEEE MEMS'09, (2009), pp. 220-223.
- [2] Held J., "Microneedle Electrode Arrays for Cellular Recording Applications," PhD Thesis University of Freiburg, 2009.
- [3] Thielecke, H. et al. "Gentle cell handling with an ultra-slow instrument: creep-manipulation of cells", Microsystems Technologies, Volume 11, Issue 11, p. 1230-1241(2005)