

Diss. ETH No. 18978, 2010

Cells and Currents

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
MICHAEL GABI
Dipl. Werkstoff-Ing. ETH
born July 1, 1976
citizen of Niederbipp BE

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Janos Vörös, examiner
Prof. Dr. Simon Philipp Hoerstrup, co-examiner
Dr. Petra Schulte, co-examiner

2010

Abstract

In the late 18th century, Luigi Galvani presented his experiments with frog legs and the newly observed form of electricity in animals. It took almost one and a half centuries until researchers began to understand how cells generate and transmit electric potentials, starting the phase of modern electrophysiological research. This discovery, and further technical developments, led to the use of electric currents in everyday clinical therapeutics; for example pacemakers, which drastically improved quality of life and life expectation of patients with cardiac problems. Scientists and engineers dream of compensating disabilities with prostheses that are directly linked to the brain, allowing feedback signals to be sent back to the brain (e.g. position of an arm prosthesis, temperature or weight of a grabbed object). The same technology could be used to reconnect broken nerve connections with an electric circuit and regain normal functionality of paralyzed limbs or organs. Moreover, brain functions could be realized on a chip, or another sense could be added to our five existing physiological perception possibilities (sight, sound, taste, smell and touch). All the science-fiction approaches we can imagine are in principle the same - they connect an electric circuit with living cells through an interface of dead and living matter. Thereby the implanted, non-degradable material provokes a foreign body reaction, leading to encapsulation by connective tissue and loss of implant functionality. If the interface also acts as an electrode for electrical cell stimulation, the applied currents induce electrochemical reactions, which create locally unfavorable conditions for the resident living cells. In this thesis, we focus on the effects of applying currents through electrodes to cells *in vitro* and *in vivo*, and we present ways to use such electric currents to control the adhesion, growth and migration of cells on electrodes.

In chapter 4, we present a high-resolution optical method to measure the pH change due to electrochemical reactions close to an ITO electrode using confocal laser scanning microscopy. This technique further allowed us to study and model pH changes in physiological solutions, where the extent of the effect is within the hundred micrometer range. Based on the predictions of our model, we were able to connect the electrochemically-induced pH changes with the observed behavior of cultured myoblasts directly grown on the electrode surface. Current densities above a certain threshold led to the uptake of a membrane impermeable dye, indicating membrane pore formation. Cells showed exactly the same effect upon exposure to low pH solutions. Based on our model, we could attribute this to the change in local pH, although we could not exclude the effects of other electrochemically created reactive molecules.

We developed a neurochip to control the adhesion and outgrowth of individual neurons by electrochemically removing protein-repellant molecules from transparent electrodes in chapter 5. The neurochip architecture is based on three parallel

indium-tin-oxide (ITO) electrodes on a SiO₂ substrate. A photoresist structure forms a landing spot for the neuron soma and two lateral outgrowth pathways for the neurites. The whole surface was turned protein and cell repellent with PLL-*g*-PEG before enabling neuron soma adhesion by selective PLL-*g*-PEG removal. After the neuron adhered, a potential was applied to the pathway electrodes, permitting neurite outgrowth along the pathways formed by the SU8 structure. We also show the possibility to control cell migration with small pulsed currents. Myoblasts were seeded on a chemical pattern of cell-adhesive PLL and cell-resistant PLL-*g*-PEG. The PLL-*g*-PEG was then electrochemically removed from the electrodes to permit migration onto the cell-free electrodes. While electrodes without applied current were confluent overgrown within 24 hrs, a small pulsed current was able to inhibit cell growth on the bare ITO electrode for more than 72 hrs. With both techniques, cell adhesion, growth, and migration can be controlled dynamically after cells start to grow on the substrate. This opens new possibilities: we believe the key to control the development of neuron networks with well-defined topology, or more complex co-cultures, is the combination of passive surface modifications and active control over the surface properties at any time during the experiment.

Based on the findings of the previous chapters, we present in chapter 6 an implantable pulse generator, which we used to study the effects of small pulsed currents on the viability of rat aortic derived cells (ROAC) *in vitro*. The chosen pulsed currents were large enough to inhibit normal cell adhesion on the active platinum surface. The cells only formed a small adhesion patch on the active surface, while keeping their globular shape, and underwent apoptosis within 24 hrs, as indicated by the positive staining for cleaved caspase-3. Inspired by these findings, we studied the effect of these currents *in vivo*, by implanting the pulse generator subcutaneously in a rat model. Although the electrode|tissue interface histology revealed no difference between the active platinum surface and the neighboring control surface, we have found a large impedance difference at high frequencies between electrodes that remained functional during the entire experiment and the ones that stopped working due to a broken connection with the function generator. 21 days after implantation, the non-working electrodes showed an increase in impedance at higher frequencies, whereas the working electrodes maintained the same impedance the entire time. This indicates that applied currents can indeed reduce the impedance of implanted electrodes and suggests an altered encapsulation process.

In the form of a feasibility study in chapter 7, we present a novel approach to prevent bacterial adhesion, colonization and encrustation of Foley catheters and urethral stent surfaces. *Proteus mirabilis* was chosen as a model for the most common bacteria to colonize such surfaces. Minutes after inserting a catheter, deposition of host urinary components starts on the catheter surface and leads to the formation of a conditioning film. Such films play an active role in the bacterial adhesion process. In artificial urine, we tried to avoid such naturally-formed conditioning films by applying different current densities to platinum electrodes. The

results were quantified using highly mass-sensitive techniques. The bacterial adhesion could be reduced significantly compared to platinum surfaces without applied currents.

Overall, in this thesis the influence of applied currents to viable cells was investigated and used to control cell adhesion, growth and migration.

Zusammenfassung

Im späten 18. Jahrhundert publizierte Luigi Galvani seine Experimente mit Froschschenkeln und die dabei neu beobachtete Form tierischer Elektrizität. Es dauerte danach fast eineinhalb Jahrhunderte bis Wissenschaftler zu verstehen begannen, wie Zellen elektrische Potenziale generieren und übertragen können. Die Phase der modernen elektrophysiologischen Forschung wurde damit eingeläutet. Diese Entdeckungen, sowie weitere technische Entwicklungen haben dazu geführt, dass elektrische Ströme heute im klinischen Alltag nicht wegzudenken sind und die Lebensdauer / Lebensqualität vieler Patienten massiv erhöhen (z.B. appliziert durch Herzschrittmacher). Der Wunschtraum vieler Wissenschaftler und Ingenieure jedoch wäre, sämtliche körperlichen Beeinträchtigungen mittels Prothesen beheben zu können. Die Steuerung könnte direkt vom Gehirn aus erfolgen, wobei auch sensorische Rückmeldungen ans Gehirn möglich wären (z.B. Position der Prothese, Temperatur oder Gewicht eines angefassten Gegenstandes). Mit derselben Technologie könnten durchtrennte Nervenfasern mit einem elektrischen Schaltkreis überbrückt und gelähmte Gliedmassen / Organe neu innerviert werden, um so ihre ursprüngliche Funktionalität wieder zu gewährleisten. Darüber hinaus könnte man Aufgaben des Gehirns auf einen Chip auslagern oder unseren fünf Sinnen (Sehen, Hören, Schmecken, Riechen und Fühlen) weitere Wahrnehmungsmöglichkeiten hinzufügen. Egal welche phantasievollen, zukünftigen Anwendungen wir uns noch vorstellen können, im Prinzip wird immer eine elektronische Schaltung mit lebenden Zellen verbunden und zwar über eine Grenzfläche aus toter und lebender Materie.

Durch die Implantierung eines körperfremden Materials wird eine Fremdkörperreaktion des Immunsystems provoziert. Rund um das nicht abbaubare Material bildet der Körper eine Bindegewebskapsel und schlussendlich führt dies zu einer reduzierten Funktionalität des Implantates. Wird diese Grenzfläche gleichzeitig für die elektrische Stimulation von Zellen verwendet, induzieren die applizierten Ströme elektrochemische Reaktionen. Für die dort angesiedelten lebenden Zellen werden durch diese Reaktionen lokal lebensfeindliche Bedingungen geschaffen.

In dieser Doktorarbeit untersuchen wir die Auswirkungen solcher Ströme *in vitro* und *in vivo* und präsentieren Möglichkeiten diese Effekte zur Kontrolle von Zelladhäsion, -wachstum und -migration zu nutzen.

In Kapitel 4 entwickelten wir eine hochauflösende Methode, um elektrochemisch induzierte pH-Änderungen in der Nähe einer ITO-Elektrode mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie sichtbar zu machen. Dies erlaubte uns pH-Änderungen in physiologischen Lösungen innerhalb eines Bereiches von 100 μm zu studieren und modellieren. Basierend auf diesem Modell konnten wir die elektrochemisch induzierten pH-Änderungen mit dem beobachteten Verhalten von Myoblasten, die direkt auf der Elektrodenoberfläche gewachsen sind, in Verbindung bringen. Stromdichten ab einem bestimmten Schwellenwert führten bei diesen Zellen zur Aufnahme

eines membranimpermeablen Farbstoffes, welcher dabei als Hinweis zur Bildung von Poren in der Zellmembran diente. Auch beim Eintauchen in Lösungen mit tiefem pH-Wert zeigten die Zellen dieselben Reaktionen. Unser Modell ermöglichte es uns, diese Beobachtungen dem tiefen pH-Wert zuzuschreiben, wobei die Wirkung anderer elektrochemisch generierter Moleküle nicht ausgeschlossen werden konnte.

In Kapitel 5 entwickelten wir einen Neurochip, um die Adhesion und das Auswachsen einzelner Neuronen mittels elektrochemischer Entfernung proteinresistenter Moleküle von einer transparenten Oberfläche kontrollieren zu können. Die Chiparchitektur basiert auf drei parallel angeordneten Indium-Zinn-Oxid Elektroden. Diese befinden sich auf einem Glassubstrat mit einer Fotolackstruktur als Landeplatz für den Neuronenkörper mit seitlichen Kanälen für das Neuritenwachstum. Die Oberfläche wurde vollständig mit protein- und zellresistentem PLL-*g*-PEG beschichtet, bevor der Platz für den Neuronenkörper mit Hilfe eines Potentials an der darunterliegenden Elektrode freigeschaltet wurde. Nach erfolgter Adhesion der Zelle konnten auch die Kanäle für das Neuritenwachstum freigelegt werden. Des Weiteren zeigen wir auch eine Möglichkeit die Zellmigration unter Nutzung kleiner gepulster Ströme zu verhindern. Myoblasten wurden daher auf einer chemisch strukturierten Oberfläche gezüchtet. Dabei konnten die Zellen nur auf dem Glassubstrat aber nicht auf den ITO-Elektroden adhären. Nach elektrochemischer Freischaltung der Elektrodenflächen konnten die Zellen die Oberflächen innerhalb von 24 Stunden konfluent überwachsen. Im Gegensatz dazu, mittels einem kleinen gepulsterten Strom, konnte die Migration der Zellen für > 72 Stunden erfolgreich verhindert werden. Mit diesen beiden Techniken können Zelladhäsion sowie Wachstum und Migration dynamisch kontrolliert werden, auch wenn die Zellen bereits auf das Substrat aufgebracht wurden.

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Kapiteln entwickelten wir in Kapitel 6 einen implantierbaren elektrischen Pulsgenerator. *In vitro* Tests mit Aortazellen zeigten, dass die gewählten Stromdichten gross genug waren, um eine normale Zelladhäsion zu verhindern. Die Zellen bildeten nur eine kleine Kontaktfläche mit der Platinelektrode und behielten ihre Kugelgestalt. Innerhalb von 24 Stunden wurden sämtliche Zellen apoptotisch, was mit Anti-Caspase-3-Antikörpern gezeigt werden konnte. Inspiriert durch diese Beobachtungen, untersuchten wir die Auswirkungen dieser Ströme *in vivo*. Dabei wurde der Impulsgenerator subkutan in Ratten implantiert. Zwar ergab die histologische Untersuchung der Elektroden|Gewebe-Grenzfläche keinen Unterschied zwischen einer aktiven Platinoberfläche und der benachbarten Kontrolloberfläche ohne angelegtem Strom. Die Impedanz bei höheren Frequenzen war jedoch für Elektroden tiefer, die während des ganzen Experimentes Strompulse abgaben, als für Elektroden, die während des Experimentes ihre Funktion einbüssten. Dies wies darauf hin, dass die Einkapselung in einer abgeänderten Form erfolgte.

In Form einer Machbarkeitsstudie in Kapitel 7 präsentieren wir einen neuartigen Ansatz zur Bekämpfung bakterieller Adhäsion, Kolonisation und deren darauffol-

genden Verkrustungen von Foley-Kathetern und Harnleiter-Stents Flächen. *Proteus mirabilis* wurde als Modell-Bakterium für urologisch wichtige Bakterien gewählt. Normalerweise bilden sich nach dem Einführen eines Katheters sofort Ablagerung von Urinkomponenten auf der Katheter Oberfläche, die zur Bildung eines sogenannten Conditioning-Film führen. Diese Ablagerungen spielen eine aktive Rolle beim Adhäsionsprozess von Bakterien. In künstlichem Urin haben wir versucht, die Bildung solcher Filme durch Anlegen verschiedener Stromdichten auf Platinelektroden zu verhindern und mit hochsensitiven Methoden zu quantifizieren. Die bakterielle Adhäsion konnte im Vergleich zu einer Platinoberfläche ohne Strom signifikant reduziert werden.

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss elektrischer Ströme auf lebende Zellen untersucht und deren Auswirkungen zur Kontrolle von Zelladhäsion, -wachstum und -migration verwendet.