

Auf Herz und Nieren prüfen

Mikrofluidische Zellkultursysteme helfen bei der Wirkstoffentwicklung und ermöglichen personalisierte Medizin.

Britta Hagemeyer, Holger Becker, Simon Werner und Martin Stelzle

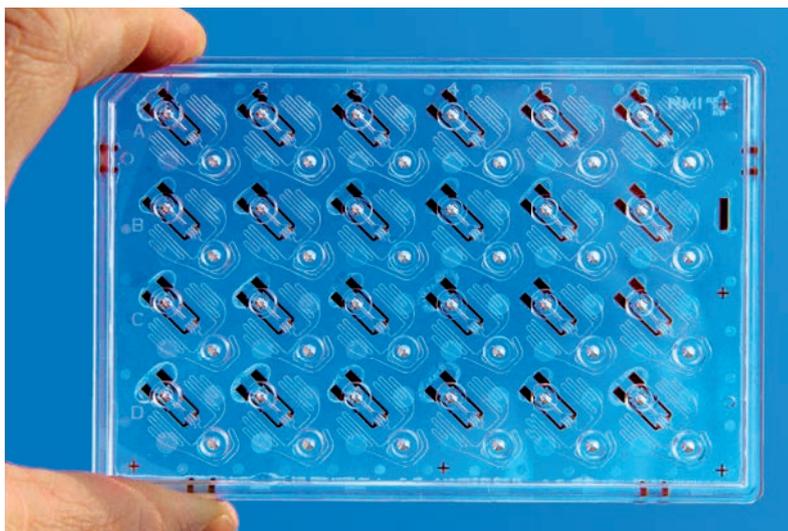
Die Funktionsweise von Organen lässt sich im Labor mit mikrofluidischen Zellkultursystemen simulieren, um beispielsweise die Wirkung eines Medikaments zu untersuchen. Um solche Organ-on-Chip-Systeme herzustellen und zu verwenden, ist Interdisziplinarität gefragt: Physiker, Ingenieure, (Bio-)Chemiker und Mikrotechnologen arbeiten mit Biologen, Toxikologen und Pharmazeuten zusammen.

Kaum jemand macht sich viele Gedanken über die Nebenwirkungen von Medikamenten, wenn es darum geht, lästige Kopfschmerzen zu bekämpfen oder den Blutdruck auf Normalmaß zu senken. Wir haben uns daran gewöhnt, mit chemischen Stoffen Fehlfunktionen unseres Körpers zu korrigieren und Leiden zu lindern. Erst wenn ein Medikament in Verdacht gerät, schwere Schäden zu verursachen und es medienwirksam vom Markt genommen wird, fragen wir uns, ob Versäumnisse bei den Tests die Ursache dafür sind.

Die Entwicklung von Wirkstoffen ist aber genau reguliert, und kein Pharmaunternehmen kann es sich leisten, nachlässig zu handeln. Als Konsequenz aus dem Contergan-Skandal wurde ein Zulassungsprozess eingeführt, der genau reguliert ist. Als 1957 der fragliche Wirkstoff Thalidomid auf dem Markt kam, war lediglich vorgeschrieben, ein Medikament zu registrieren. Weil der Wirkstoff für Missbildungen bei Neugeborenen verantwortlich war, wurde das Medikament vier Jahre später vom Markt genommen.

Heute versuchen Forscher nach der ersten Identifizierung einer potenziell wirksamen chemischen Substanz, ihre Wirksamkeit systematisch zu verbessern und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren, indem sie ihre Grundstruktur modifizieren. Dazu werden Wirkstoffkandidaten in der präklinischen Forschung an Zellkulturen und nachfolgend an Tieren, insbesondere an Nagern, getestet. Wird dabei keine Toxizität entdeckt, folgt die klinische Phase an menschlichen Probanden. Die Zulassung erfolgt erst, wenn Wirksamkeit und Sicherheit des neuen Medikaments nachgewiesen sind.

Gerade in Bezug auf toxische Nebenwirkungen wie eine Schädigung der Leber hat sich jedoch gezeigt, dass Tierversuche diese Effekte im Menschen nicht immer zuverlässig vorhersagen. Die Unterschiede der Organismen sind groß – manchmal mit lebensbedroh-



Mit der HepaChip-Multiwellplate soll die Wirkung chemischer Stoffe oder Medikamente auf die Leber untersucht werden.

lichen Folgen. So brachte eine in vorangegangenen Tierversuchen nicht beobachtete Immunreaktion auf einen neuen Rheumawirkstoff im Jahr 2006 sechs Probanden in Lebensgefahr [1]. In Zellkulturen werden zwar menschliche Zellen eingesetzt. Aber eine Anordnung von Zellen auf dem Boden einer Petrischale entbehrt für die Zellfunktion essenzielle Merkmale eines Organs. Entsprechend begrenzt ist daher der Nutzen dieser Testsysteme.

Um die Kosten für die Medikamentenentwicklung in der klinischen Phase der Entwicklung zu senken und um das Risiko der Probanden zu minimieren, ist es entscheidend, ungeeignete Wirkstoffkandidaten möglichst frühzeitig mit hoher Treffsicherheit zu erkennen und auszusortieren. Gleichzeitig soll aber kein potenziell brauchbarer Wirkstoff verworfen werden,

KOMPAKT

- Ein Organ-on-Chip-System bildet meist die kleinste funktionelle Einheit eines Organs ab.
- Menschliche Zellen werden in einer Mikroumgebung gemäß ihrem natürlichen Vorbild angeordnet.
- Die Auswirkung von Medikamenten lässt sich mittels biochemischer Nachweismethoden überprüfen.
- Zukünftig könnte der Einsatz von Organ-on-Chip-Systemen Tierversuche reduzieren und personalisierte Medizin ermöglichen.

Dipl.-Bioinf. Britta Hagemeyer, Simon Werner, M.Sc., und Dr. Martin Stelzle, Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen (NMI), Markwiesenstr. 55, 72770 Reutlingen, Dr. Holger Becker, microfluidic ChipShop GmbH, Stockholmer Str. 20, 07747 Jena

1) Unsere Forschung am NMI fördern das BMBF (031A121F, 01GG0729 und 16SV5952) und das Bundesland Baden-Württemberg (7-4332.62-NMI/37).

weil in der präklinischen Phase eine Nebenwirkung angezeigt wurde, die im Menschen gar nicht auftreten würde.

Daher gilt es, zuverlässigere Tests für die präklinische Forschung zu entwickeln. Den Ausgangspunkt bilden der menschliche Organismus und seine Organe, deren kleinste Funktionseinheiten in mikrofluidischen Zellkultursystemen nachgebildet werden. Diese Organ-on-Chip-Systeme basieren auf menschlichen Zellkulturen mit organähnlicher Struktur. Die zentrale Idee dieses Forschungsansatzes besteht darin, die natürliche Funktion der Zellen zu erhalten und zuverlässige Antworten auf die Stimulation mit Medikamentenkandidaten zu geben. Doch auf welche Organe kommt es an? Welche Eigenschaften gilt es zu imitieren, um Funktionen zu erhalten, die mit der In-vivo-Situation vergleichbar sind?

Die inspirierende Vision dieses Arbeitsgebiets besteht darin, eine völlig neue Klasse von Testsystemen bereitzustellen, die in Aufbau und Funktion den menschlichen Organismus mit bisher unerreichter Präzision nachbilden. Für die biologische Grundlagenforschung sind Organ-on-Chip-Systeme ein vielversprechendes Werkzeug, um die Funktion und das Zusammenwirken von Organen und physiologische Prozesse besser zu verstehen, die in vivo nicht oder nur schwer zugänglich sind.

Drei Anwendungsfelder von hoher praktischer und (gesundheits-)wirtschaftlicher Bedeutung werden absehbar von dieser Forschung profitieren:

- Die Toxizität von Wirkstoffkandidaten für den menschlichen Organismus soll mit deutlich verbesserter Zuverlässigkeit vor Eintritt in die klinische Prüfung vorhersagbar werden.
 - Ein möglicher Verzicht auf Tierversuche oder zumindest eine signifikante Reduktion ist langfristig zu erwarten.
 - Der Einsatz von Mikroorganen aus Zellen, die dem Patienten entnommen wurden, soll diagnostische und therapeutische Ansätze für eine personalisierte Medizin ermöglichen.
- Die genetische und damit auch physiologische Individualität jedes Menschen legt eine personalisierte Tumorthherapie nahe, die bessere Behandlungsergebnisse verspricht als bisherige „One-fits-all“-Strategien.

Organe aus dem Mikrotechniklabor

Im Allgemeinen gilt es, die dreidimensionale Architektur des Organs als eine Anordnung von Zellen in organähnlichen Dimensionen abzubilden. Dabei sollen die unterschiedlichen Zelltypen im korrekten, d. h. dem für das betreffende Organ typischen Verhältnis vorkommen und in eine aus Proteinen bestehende Extrazellulärmatrix eingebettet sein. Eine kontinuierliche Perfusion mittels Mikrokanälen sorgt für die Zufuhr von Nährstoffen und für auf die Zellen wirkende Scherkräfte, wie sie auch im Organ vorkommen. Mikrofluidik ermöglicht es, die Zusammensetzung der Medien und die Bedingungen in der Zellkultur räumlich und zeitlich präzise einzustellen. Aktuelle Forschungsansätze verfolgen das Ziel, diese Kriterien für wichtige Organe wie Leber, Niere, Lunge, Darm, Herz oder Gehirn (Tab. 1) zu erfüllen [2 – 4].

Die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet zeigen eindrucksvoll, dass Mikrosystemtechnik und Mikrofluidik vorzügliche und unverzichtbare Technologien sind, um Organ-on-Chip-Systeme zu realisieren. Denn Zellbiologie spielt sich auf der Mikrometerskala ab: Typische Zelldurchmesser betragen 5 bis 30 µm. Auch die Flüssigkeitsströmungen in Organen verlaufen in diesen Dimensionen mit laminaren Flussprofilen, die entsprechend gut in Mikrofluidiksystemen definierbar sind. Der Stofftransport durch Diffusion ist auf der Mikrometerskala ebenfalls schnell und effizient. Benetzungsphänomene dominieren und helfen dabei, fluidische Prozesse in Mikrofluidiksystemen zu steuern. Wie im Folgenden näher erläutert, ist es wichtig, die Zellen aktiv zu assemblieren, um dreidimensionale Strukturen aufzubauen. Dazu bietet sich Dielektrophorese als Werkzeug an.

Als Beispiel für die theoretischen Überlegungen und technischen Lösungsansätze zur Entwicklung eines mikrofluidischen Zellkulturmodells beschreiben wir den HepaChip® – ein Modell für die Leber.¹⁾

Akademische und industrielle Forschung zu Organ-on-Chip-Systemen	
Firma / Institut	Arbeitsgebiet
AlveoliX AG, Bern, Schweiz (ind.)	Lunge
CN Bio Innovations Ltd., Hertfordshire, Großbritannien (ind.)	Leber
Emulate Inc., Human Emulation System, Boston, USA (ind.)	Lunge, Thrombose, Darm
hDMT, Utrecht, Niederlande (akad.)	Herz, Gefäße, Blut-Hirn-Schranke
Hickman Hybrid Systems Lab, University of Central Florida, USA (akad.)	10-Organ-Chip, Body-on-Chip
Donald D. Ingber, Wyss Institute, Harvard University, USA (akad.)	Lunge
InSphero AG, Schlieren, Schweiz (ind.)	Leber, Tumor
Noo Li Jeon, Multiscale Biomedical Engineering Laboratory, Seoul National University, Südkorea (akad.)	Gehirn, Blutgefäße, Lymphgefäße
Roger D. Kamm, Biological Engineering, MIT, USA (akad.)	Mikrogefäße
Peter Loskill, Fraunhofer IGB, Stuttgart (akad.)	Herz, Fettgewebe, Hirn
MIMETAS B.V., Leiden, Niederlande (ind.)	Leber, Gefäße, zentrales Nervensystem
Alexander S. Mosig, Jena Center for Soft Matter, Universität Jena (akad.)	Darm, Leber
Linda G. Griffith, National Center for Advancing Translational Sciences, USA (akad.)	Multiorgane u. a.
NMI, Universität Tübingen (akad.)	Leber, Krebs, Blut-Hirn-Schranke, Herz, Nervensystem
Nathalie Picollet-D'Hahan, CEA, Frankreich (akad.)	Prostata
Michael L. Shuler, Biomedical Engineering, Cornell University, USA (akad.)	Leber, Dickdarm, Magen-Darm-Trakt, Lunge
TissUse GmbH, Berlin (ind. / akad.)	Leber, Haut, Niere, Darm
vasQlab, Eggenstein-Leopoldshafen (ind. / akad.)	Blutgefäße
John P. Wikswo, VIBRE, Vanderbilt University, USA (akad.)	Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Herz
Martin Yarmush, BioMEMS Resource Center, USA (akad.)	Leber, Blut-Hirn-Schranke u. a.

Tab. 1 Weltweit bemühen sich Forscher, Organ-on-Chip-Systeme zu realisieren. Sie arbeiten für Unternehmen (ind.) oder an Forschungseinrichtungen (akad.)

Die Leber als Paradebeispiel

Die Leber ist ein besonders interessantes Organ für die Wirkstoffforschung. Alles, was wir zu uns nehmen, gelangt nach der Aufnahme über den Darm durch das Blut zur Leber. Dort wird es in den Hepatozyten chemisch umgebaut und für die weitere Verwendung im Körper verfügbar gemacht. Viele Wirkstoffe werden erst durch diese Modifikation wirksam. Schädigen Wirkstoffe die Leber, kommen sie für den Einsatz als Medikament nicht infrage. Als eine der häufigsten Ursachen für das Scheitern von Wirkstoffen gilt es, dies möglichst frühzeitig zu erkennen.

Um die Leber als Organ-on-Chip-System zu realisieren, ist es erforderlich, die wesentlichen Merkmale des Organs, ausgehend vom physiologischen Vorbild, zu abstrahieren. Das Lebersinusoid stellt die kleinste funktionelle Einheit der Leber dar (Abb. 1). Es besteht aus einer länglichen Anordnung von Hepatozyten, umgeben von Proteinen der Extrazellulärmatrix und Endothelzellen, welche die Wand der Blutgefäße bilden, sowie weiteren Zelltypen in geringerer Anzahl. Entlang dieser etwa 25 bis 30 Zellen langen Struktur (ca. 0,5 mm) bildet sich in vivo ein Gradient von gelöstem Sauerstoff und Metaboliten aus sowie eine Variation der Proteinexpression in den Hepatozyten („Zonierung“). Daher sind im Organ-on-Chip-System Hepatozyten und Endothelzellen so auf einer Schicht eines Extrazellulärmatrixproteins angeordnet, dass sie sich nachfolgend perfundieren und mit Zellkulturmedien versorgen oder mit Testsubstanzen inkubieren lassen.

Eine derartige Struktur lässt sich nicht durch die in konventionellen Zellkultursystemen genutzte Zellsedimentation auf planare Oberflächen herstellen, weil dabei lediglich ein zweidimensionaler „Zellrasen“ entsteht. Vielmehr ist ein aktives Assemblierungsverfahren nötig, das auch für die verschiedenen, im Lebersinusoid enthaltenen Zelltypen in ähnlicher Weise anwendbar sein muss.

Dielektrophorese eignet sich für die Manipulation von Zellen besonders gut, da sie auf alle Zelltypen anwendbar ist und die hierfür erforderlichen elektrischen Felder in Mikrodimensionen ohne exzessive Joule-Erwärmung entstehen. Die hochfrequenten inhomogenen elektrischen Wechselfelder F_{DEP} führen bei geeigneter Einstellung der relativen Polarisierbarkeit von Zellen und umgebendem Medium zu Dipolkräften [5 – 7]:

$$F_{DEP} = 2\pi R^3 \epsilon_m \text{Re}(f_{CM}) \nabla E^2.$$

Hier bezeichnen R den Partikelradius, E das elektrische Feld, ϵ_m die Polarisierbarkeit des Mediums und f_{CM} den Clausius-Mossotti-Faktor gemäß

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m},$$

wobei ϵ_p die Polarisierbarkeit der Partikel bzw. Zellen beschreibt. Der Clausius-Mossotti-Faktor kann je nach Verhältnis der Polarisierbarkeit von Medium und Zellen positive oder negative Werte annehmen. Ein posi-

tiver Wert bedeutet, dass die Zellen in Bereiche hoher Feldstärke gezogen werden, während sie bei einem negativen Wert aus solchen Bereichen herausgedrängt werden. Beide Regime lassen sich durch geeignete Wahl der Mediumleitfähigkeit einstellen. Weil positive Dielektrophorese eine geringere Ionenstärke benötigt, nimmt die Osmolarität des Mediums ab. Zur Kompensation gibt man Zuckermoleküle hinzu, die ein Platzen der Zellen verhindern. Damit die Dielektrophorese für eine korrekte Zellanordnung sorgt, muss die Topologie der Zellkammer so ausgeführt sein, dass Minima bzw. Maxima der Felder die Zellen automatisch an den gewünschten Ort transportieren. Simulationen helfen dabei, die Topologie zu optimieren. Für das Lebersinusoid ergibt sich eine Kammer mit Stegen, die den Leiterquerschnitt zwischen zwei peripher angeordneten Elektroden verringern. Die Feldmaxima entstehen an den Kanten der länglichen Engstellen zwischen Stegobersseite und Deckelfolie (Abb. 2a).

Ein Chip für die Leber

Eine Multiphysik-Simulation²⁾ der hydrodynamischen und dielektrophoretischen Kräfte auf die Zellen zeigte, dass die Zelltrajektorien von der Position der Zelle am Eingang der Zellkammer abhängen: Sind die dielektrophoretischen Kräfte groß genug, enden die Trajektorien auf einem der Assemblierungsstege. Ansonsten verlassen die Zellen die Kammer wieder (Abb. 2b, c). Neben der Assemblierungseffizienz sind die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte, die thermische Belastung der Zellen durch die elektrischen Felder sowie die Befüllbarkeit der Struktur entscheidende Parameter [8 – 10]. Diese gilt es zu optimieren, bevor die Struktur mit teilweise aufwändigen und kostspieligen Methoden der Mikrotechnologie hergestellt wird.

Mikroelektroden lassen sich so in der Zellkammer platzieren, dass die darin erzeugten elektrischen Felder quasi „automatisch“ zu einer Assemblierung der Zellen

2) durchgeführt mit dem kommerziellen Softwarepaket CFD-ACE+ der ESI GmbH

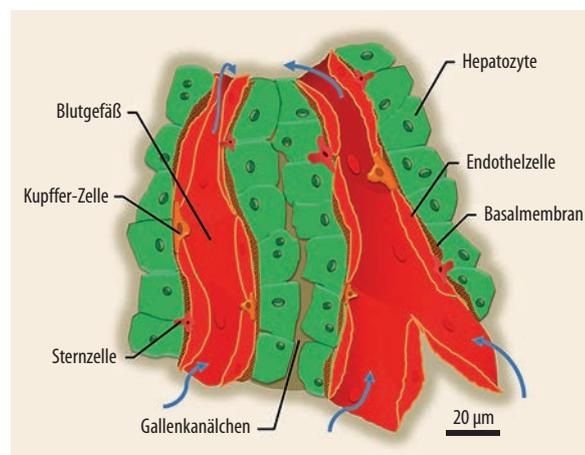


Abb. 1 Das Lebersinusoid ist die kleinste funktionelle Einheit der Leber. Die Leberzellen (Hepatozyten) sind länglich angeordnet und von Endothelzellen umgeben. Zwischen Hepatozyten und Endothelzellen befindet sich die Basalmembran. Gallenkanälchen sind zwischen den Hepatozyten angeordnet.

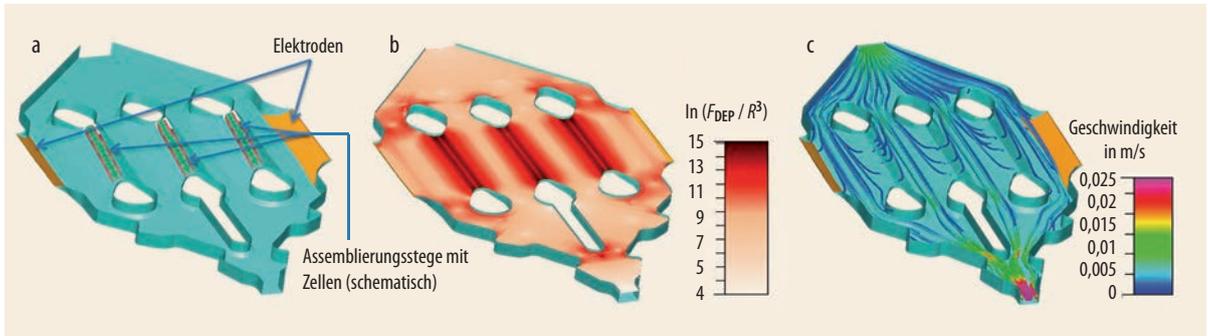


Abb. 2 Das Design der Zellkulturkammer (a) des HepaChips wurde mithilfe einer Multiphysik-Simulation optimiert. Die dielektrophoretischen Kräfte, welche auf die Zellen wirken (b), bestimmen zusammen mit den hydrodynamischen Kräften die Zelltrajektorien in der Kulturkammer (c). Das längliche Lebersinusoid entsteht auf den Oberseiten der Stege.

in der gewünschten Organstruktur führen. Die dazu notwendige 3D-Topologie der Zellkammer wird aus der Struktur der kleinsten funktionellen Einheit eines Organs abgeleitet. Die dielektrophoretische Zellassemblierung unterscheidet sich hierin von sonst gebräuchlichen Methoden, die lediglich gravitationsgetriebene Sedimentation als großräumig wirkende Triebkraft für die Anordnung von Zellen nutzen. Außerdem werden durch Dielektrophorese nur lebende Zellen mit intakter Zellmembran assembliert. Die Polarisierbarkeit toter Zellen unterscheidet sich nicht genug von der des Mediums, damit ein effektives Dipolmoment entsteht.

Zellen nehmen über Rezeptoren an ihrer Zellmembran ihre Umgebung wahr und reagieren auf sie. Daher ist eine organähnliche chemische Ausgestaltung der Zellkammer essenziell, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen und den Erhalt ihrer zelltypischen Eigenschaften – ihres Phänotyps – zu gewährleisten. Im Fall des HepaChip® dient kurzwellige UV-Strahlung ($\lambda = 185 \text{ nm}$) dazu, die Assemblierungsbereiche vor dem Verschluss des Mikrofluidikchips mithilfe einer Schattenmaske zu belichten. Dadurch entstehen Säuregruppen auf der Oberfläche des Polymers COP (Cyclic Olefine Polymer), aus dem der Chip gefertigt wird. Beim Spülen mit einer wässrigen Lösung eines Extrazellulärmatrixproteins und Pluronic® koppeln die Pro-

teine über Peptidbindungen an die Säuregruppen. Die UV-belichtete Oberfläche wird selektiv mit einem Kollagen beschichtet (Abb. 3), während die nicht belichteten Bereiche des Mikrofluidiksystems durch Adsorption von Pluronic® zell- und proteinabweisend werden. Anschließend assemblieren die passenden Zellen bevorzugt an der Kollagenschicht.

Schon beim Design eines Organ-on-Chip-Systems ist der gesamte Prozessablauf zu berücksichtigen: das Befüllen des Mikrofluidiksystems, die Kultivierung der Zellen, die spätere Zugabe chemischer Substanzen und die Entnahme von Proben. Auch die Methoden oder „Assays“, mit denen sich Informationen über das biochemische und biologische Verhalten der Mikroorgane gewinnen lassen, spielen eine wichtige Rolle.

Störende Luftblasen

Für das fertige Design sind Luftblasen wahrscheinlich das größte Problem. In den Mikrodimensionen der Chips ist das Verhältnis von Kontaktlinien zu Oberflächen groß. Daher können sich Luftblasen an kleinsten Kanten anheften und die feinen Kanäle „verstopfen“. Sie verhindern damit eine ordnungsgemäße Perfusion des Organ-on-Chip-Systems. Zudem zerstören die Luftblasen bei Kontakt mit den Zellaggregaten die empfindlichen Lipid-Bilayer-Membranen der Zellen.

Auch die Benetzbarkeit des Chipmaterials beeinflusst die Befüllbarkeit und die fluidischen Eigenschaften von Organ-on-Chip-Systemen. Das hydrophobe Material COP besitzt sehr gute optische Eigenschaften sowie eine gute Biokompatibilität und ist mittels Spritzguss sehr präzise abformbar. Allerdings reichen Kapillareffekte nicht aus, um die hydrophoben Oberflächen selbsttätig zu benetzen, sodass ein externer Druck die Befüllung antreiben muss. In den kleinen Kanaldimensionen eines Mikrosystems sind zusätzlich besondere fluidische Steuerungselemente, sog. Kapillarstopps, möglich. An einem Kapillarstopp verharrt der Meniskus der gepumpten Flüssigkeit durch abrupte Änderungen im Kanalquerschnitt, z. B. bei Aufweitung des Kanals. Die Flüssigkeit fließt erst weiter, wenn der Druck einen maximalen, einstellbaren Berstdruck übersteigt [8].

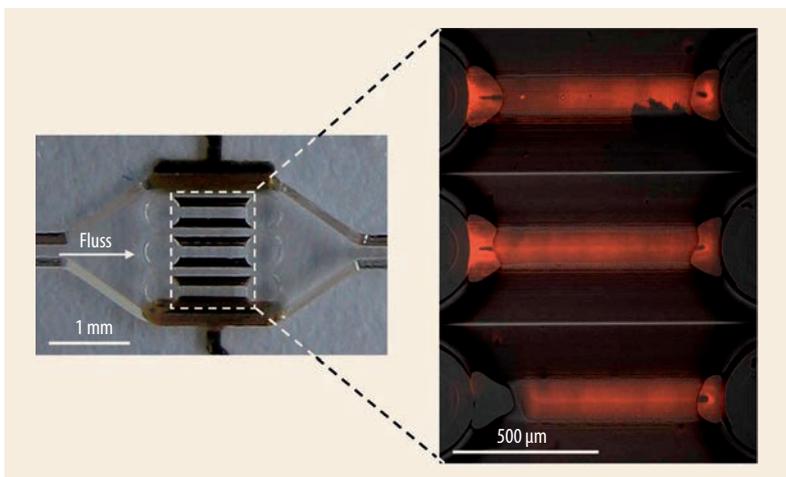


Abb. 3 Die Bestrahlung der Zellkammern des HepaChip® mit UV-Licht und einer Schattenmaske erlaubt es, die Oberflächen zu funktionalisieren. Kollagen (rechts, rot) lagert sich bevorzugt auf den Assemblierungsstegen an.

Weil die Sensitivität biochemischer Nachweismethoden begrenzt ist, erfordern ausreichende Probenmengen eine Mindestanzahl von Zellen. Im Fall des HepaChip® sind dazu mehrere Sinusoide fluidisch „parallel geschaltet“. Die Kanäle und Zellkammern enthalten also Bifurkationen, um alle Sinusoide zu kontaktieren. Dabei müssen die einzelnen Stränge vergleichbare Strömungswiderstände aufweisen, damit beim späteren Betrieb des Systems die gleiche Flussrate in allen Zellkammern vorliegt. Kritische Stellen sind dabei die Zusammenführungen der Kanäle: Nur wenn beide Wege vollständig befüllt sind und die Menisken unmittelbar an der Bifurkation verschmelzen, füllt sich jeder Zweig luftblasenfrei, und eine spätere Durchströmung wird möglich.³⁾ Der HepaChip® besitzt dazu eine Kaskade von Kapillarstopps mit unterschiedlichen Berstdrücken [8].

Wie nützlich Organ-on-Chip-Systeme tatsächlich sind, entscheiden die Art und Vielfalt der Experimente, denen sie zugänglich sind, und die Datenqualität. So liefert optische Mikroskopie wichtige Informationen über Struktur, Vitalität und Funktion von Mikroorganismen (Abb. 4). Sensitive biochemische Analysemethoden ermöglichen es, Testsubstanzen zu untersuchen, die mit dem perfundierten Medium zu den Zellaggregaten gelangen. Anhand von Proben zeigt sich, wie die Substanzen transportiert, aufgenommen, umgewandelt oder absorbiert werden. Im HepaChip® liefern diese Experimente Aufschluss über den Metabolismus und die Toxizität einer Substanz in der Leber [11].

Dabei stellt das große Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen im mikrofluidischen System ein Problem dar: Der so genannte IC50-Wert bezeichnet diejenige Konzentration eines Stoffes, bei der gerade 50 Prozent der Maximalwirkung bzw. Toxizität erreicht werden. Um den IC50-Wert zuverlässig zu bestimmen, muss zunächst die genaue Wirkstoffkonzentration am Ort des Zellaggregats bekannt sein. Viele Testsubstanzen sind jedoch relativ hydrophob. Polymermaterialien wie Polydimethylsiloxan (PDMS), aus denen Organ-on-Chip-Systeme heute vielfach bestehen, besitzen eine poröse Oberfläche und neigen dazu, hydrophobe Moleküle aufzunehmen (Infokasten). Die Volumina der Wirkstoffe im Mikroliterbereich sind im Vergleich zu den Oberflächen von einigen Quadratmillimetern relativ klein, sodass die Konzentration des Wirkstoffs

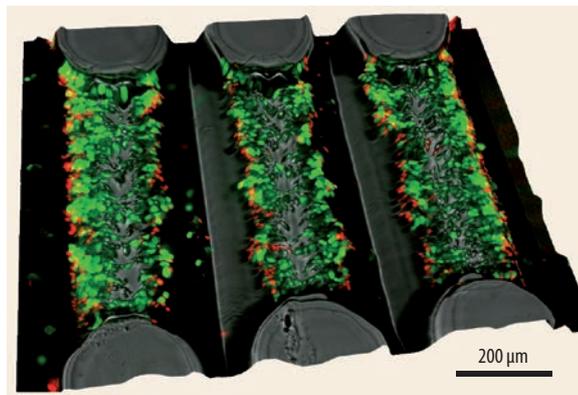


Abb. 4 Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Zellkammer mit drei Sinusoidstrukturen zeigt, dass die Hepatozyten zentral angeordnet (grün) und von nachfolgend assemblierten Endothelzellen (rot) umgeben sind.

an der Zellkultur signifikant von der gemessenen abweichen kann. Dann lassen sich Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge nicht mehr präzise bestimmen.

Obwohl diese Problematik für PDMS bekannt ist [12], kommt das Material aufgrund seiner Vorteile zum Einsatz. Das Polymer ist biokompatibel und besitzt sehr gute optische Eigenschaften und lässt sich mit vergleichsweise einfachen Herstellungs- und Bondingverfahren bearbeiten [13]. Hinzu kommt, dass es gegenwärtig kein anderes Material gibt, das wie PDMS gleichzeitig mikrostrukturierbar und mechanisch verformbar ist. Mit PDMS lassen sich Organe nachbilden, in denen die Applikation mechanischer Reize essenziell für eine organähnliche Funktion ist, z. B. in Modellen der Lungenbläschen [14, 15].

Einsatz im Laboralltag

Damit Organ-on-Chip-Systeme im Laboralltag Einzug halten, müssen sie folgende Anforderungen erfüllen:

- Die Fertigungsmethoden sollten bezogen auf die Stückzahl skalierbar sein, um einfach vom Proof-of-Concept zur validierten Testmethode zu gelangen.
- Die verwendeten Materialien sollten eine extrem niedrige Adhäsivität gegenüber hydrophoben Molekülen besitzen.
- Die Chipformate und Prozesse sollten kompatibel zu Industriestandards und bestehenden Apparaturen sein.

3) Ein Video der Befüllung ist unter <http://bit.ly/2c9FcDx> zu sehen.

FERTIGUNG VON MIKROCHIPS

Um Chips zu fertigen, sind heute mehrere Technologien gebräuchlich, die auf unterschiedlichen Methoden und Materialien basieren. Daraus ergeben sich verschiedene Vor- und Nachteile.

■ Bei der **Dünnschicht- und Mikrostrukturtechnologie** kommen Photolithographie, Ätztechniken und Waferbonding auf Glas oder Silizium zum Einsatz. Damit lassen sich hochpräzise Chips herstellen, die es erlauben, Elektroden zu integrieren und Oberflächen zu funktionalisieren. Die Technik ist

allerdings sehr teuer und nicht für dreidimensionale Strukturen geeignet.

■ Die **Soft Lithography** arbeitet mit dem Kunststoff Polydimethylsiloxan (PDMS). Durch Mikroformen, Abgießen und Plasmaaktivierung entstehen hochpräzise, flexible und verformbare Chips. Die Methode ist einfach und günstig, aber die Chips neigen zu hoher Adsorption hydrophober Stoffe. Elektroden zu integrieren, ist nicht trivial; das Funktionalisieren von Oberflächen ist schwierig.

■ Thermoplaste Polymere (z. B. COP) sind die Basis für verschiedene **Mikrospritzguss-Technologien**. Die Chips entstehen durch Ultrapräzisionsfräsen, das Verwenden von Schattenmasken, Inkjet-Drucken und Bonding. Räumliche Strukturen sind möglich; die Verfahren lassen sich für variable Stückzahlen skalieren. Die hochpräzisen Chips mit teils hervorragenden optischen Eigenschaften benötigen aber sehr teure Formen. Ihre Oberflächen zu funktionalisieren, ist nicht trivial.

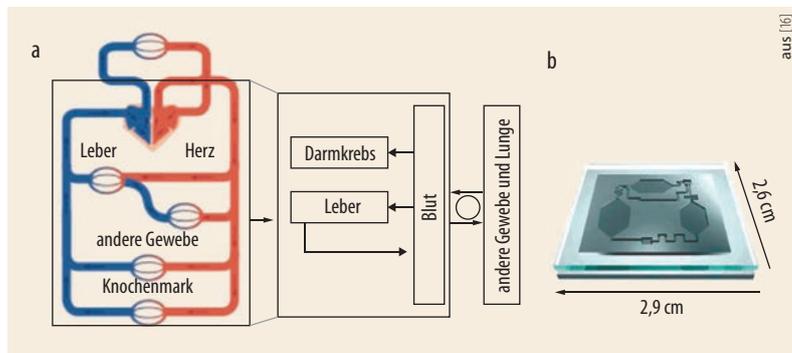


Abb. 5 Wirkstoffe werden im Körper verstoffwechselt (a). Ihre zeitabhängige Verteilung lässt sich mittels eines Body-on-Chip-Systems (b) simulieren.

Die HepaChip®-Multiwellplatte (Abb. auf S. 31) erfüllt diese Anforderungen: Sie enthält 24 Zellkulturbereiche im Industrieformat der Mikrotiterplatte. Dadurch kann ein Laborroboter die Zufuhr von Medien und die Entnahme von Probenlösungen übernehmen. Anders als beim Einzelchip verbindet die HepaChip®-Multiwellplatte Schläuche nicht dauerhaft mit einem Pumpensystem, um die kontinuierliche Perfusion der Mikroorgane zu gewährleisten. Eine Flussrate von 0,1 bis 0,3 μl entsteht mit dem integrierten mäanderförmigen Fluidwiderstand mittels eines gravitationsgetriebenen Flusses aus Tanks, die auf Luer-Anschlüsse aufgesteckt werden. Bei einem Füllstandsunterschied von ein bis zwei Zentimetern ergibt sich anfangs eine Druckdifferenz von 100 bis 200 Pa. Der Verzicht auf jegliche Schlauchverbindungen ermöglicht es, die HepaChip®-Multiwellplatte unter Sterilwerkbänken und in Inkubatoren einzusetzen. Dieses in der Zellbiologie übliche Vorgehen ist eine wichtige Voraussetzung, damit die potenziellen Anwender die neue Technologie akzeptieren. Neben dem rein passiven Fluss ist zusätzlich eine von der Standardflussrate abweichende Perfusionsgeschwindigkeit einstellbar. Dazu wird ein Pipettierroboter mit den in den Luer-Anschlüssen integrierten, konusförmigen Anschlüssen verbunden. Diese druckdichte Kontaktierung kommt während der erstmaligen Befüllung des Chips sowie bei der Zellassemblierung zum Einsatz.

Der Weg zu mikrophysiologischen Systemen

Neben der Leber werden für viele weitere Organe mikrofluidische Organ-on-Chip-Systeme entwickelt (Tab. 1). Beispielsweise bildet die Blut-Hirn-Schranke die Barriere zwischen Blutkreislauf und zentralem Nervensystem [16]. Die meisten heute verfügbaren Wirkstoffe (98 Prozent) können diese Barriere nicht passieren. Um Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Epilepsie medikamentös zu therapieren, müssen die Wirkstoffe aber zum Gehirn gelangen. Mit den heute verwendeten Modellen der Blut-Hirn-Schranke lässt sich dieser Prozess nicht zuverlässig testen.

Obwohl Organe eigenständige Entitäten sind, stehen sie im Körper miteinander in Wechselwirkung und beeinflussen sich in ihrer Funktion gegenseitig, indem sie Metaboliten und Botenstoffe austauschen. Dieses komplexe Zusammenspiel versuchen Forscher

in Body-on-Chip-Systemen nachzubilden (Abb. 5). Dabei reicht es nicht aus, mehrere Organ-on-Chip-Systeme einfach aneinander zu koppeln: Das relative Verhältnis der Zellen innerhalb der einzelnen Organe, aber auch zwischen den Organen, und die Flussraten zwischen den Organen müssen den Werten im Körper entsprechen. Gleiches gilt für das Verhältnis von Zellmasse zu Fluidvolumen und die Scherkräfte, die aus der Perfusionsrate resultieren. Beispielsweise ändert sich der Sauerstoffgehalt des Blutes oder der Gehalt an Botenstoffen, Nährstoffen und Metaboliten, wenn das Blut verschiedene Organe passiert. Ein Body-on-Chip-System muss diese Veränderungen berücksichtigen – die technische Umsetzung davon ist alles andere als trivial. Aktuelle Forschungsansätze bestehen häufig noch aus einer Anordnung zweidimensionaler Zellkulturen der verschiedenen Organtypen. Sie wachsen auf einer perforierten Membran, und ein gemeinsames Medium wird vorbeigepumpt [13]. Der Weg bis zu einem realitätsnahen Body-on-Chip-System ist also noch weit.

Literatur

- [1] G. Suntharalingam et al., *New Engl. J. Med.* **355**, 1018 (2006)
- [2] A. Perestrelo et al., *Sensors* **15**, 31142 (2015)
- [3] E. W. Esch et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 248 (2015)
- [4] F. Zheng et al., *Small* **12**, 2253 (2016)
- [5] H. A. Pohl, *Dielectrophoresis*, Cambridge Univ. Press, New York (1978)
- [6] J. Kentsch et al., *IEE Proc. – Nanobiotechn.* **150**, 82 (2003)
- [7] M. Dürr et al., *Electrophoresis* **24**, 722 (2003)
- [8] B. Hagemeyer, F. Zechmull und M. Stelzle, *Biomicrofluidics* **8**, 056501 (2014)
- [9] F. Holzner et al., *Electrophoresis* **32**, 2366 (2011)
- [10] J. Schütte et al., *Biomedical Microdevices* **13**, 493 (2011)
- [11] P. Godoy et al., *Archives of Toxicology* **87**, 1315 (2013)
- [12] J. D. Wang et al., *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 1862 (2012)
- [13] I. Maschmeyer et al., *Lab on a Chip* **15**, 2688 (2015)
- [14] D. Huh et al., *Sci. Transl. Med.* **4**, 159ra147 (2012)
- [15] A. O. Stucki et al., *Lab on a Chip* **15**, 1302 (2015)
- [16] M. L. Shuler, *Ann. of Biomed. Eng.* **40**, 1399 (2012)

DIE AUTOREN

Britta Hagemeyer studierte Bioinformatik in Tübingen und fertigte 2007 ihre Diplomarbeit am NMI an. Seit 2008 ist sie dort angestellt als Wissenschaftlerin.

Holger Becker (FV Halbleiterphysik und Biologische Physik, AIW) studierte Physik in Heidelberg und Perth. Nach der Promotion in Heidelberg folgte ein Aufenthalt am Imperial College in London. 2002 gründete er zusammen mit seiner Frau die Firma microfluidic ChipShop GmbH.

Simon Werner studierte Mechatronik an der Hochschule Reutlingen und arbeitet seit 2007 am NMI. 2014 schloss er an der Fernuni Hagen sein Masterstudium ab.

Martin Stelzle (FV Chemische Physik und Polymerphysik) studierte Physik in Erlangen und München. Nach der Promotion an der TUM war er als Postdoc am IBM Almaden Research Center, USA, und am MPIKG in Berlin. Seit 1996 ist er am NMI und leitet die AG BioMEMS & Sensorik seit 2000.

