

Ein Chip mit Herz

Kompakte Plattform für anspruchsvolle Perfusionszellkulturen

Die 3D-Zellkultur wird in naher Zukunft in der modernen medizinischen Forschung einen immensen Stellenwert einnehmen. Ihre Verbreitung reicht dabei von Assays zur Toxizitätstestung über Gewebemodelle zur Charakterisierung von Pathogenitätsmechanismen bis hin zu rekonstruierten Gewebeimplantaten. Für die Umsetzung solcher 3D-Zellkulturen stellen Lab-on-Chip-Systeme mit integrierten Mikropumpen ein unverzichtbares Werkzeug dar.

Dreidimensionale, organotypische Gewebekulturen sind aktuell noch selten, stoßen jedoch in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie sowie der medizinischen Forschung auf wachsendes Interesse. Sie können Gewebe- und Zellfunktionen bedeutend besser abbilden als klassische, zweidimensionale Zellkulturmodelle. Die Nachbildung von Organfunktionen durch Gewebekulturen stellt jedoch

eine interdisziplinäre Herausforderung dar. So bedürfen viele Zell- und Gewebetypen einer kontinuierlichen Nähr- und Sauerstoffversorgung und sind deshalb häufig nur in dynamischen, kontinuierlich perfundierten, miniaturisierten Lab-on-Chip-Systemen (LoC) etablierbar. Für einige künstlich erzeugte Gewebetypen wie Haut, Haarfollikel, Leber oder miniaturisierte Blutgefäße existieren schon weit fortgeschrittene Modelle, welche einen hohen Grad an Komplexität und somit auch organtypischer Funktionalität aufweisen.

Perfusion als Schlüssel für die 3D-Zellkultur

Für die Nachbildung von Gefäßen und vaskularisierten Geweben werden seit einigen Jahren perfundierte LoC verwendet, da diese die im Körper auf die gefäßauskleidenden Zellen (Endothelzellen) wirkenden Scherkräfte nachahmen können. Dazu ist es bei einfachen Assays

ausreichend, die Zellen über einen gravitationsgetriebenen Flüssigkeitsstrom aus einem höherliegenden Reservoir zu versorgen. Alternativ können für komplexere Assays externe Pumpen verwendet und der Volumenstrom präzise eingestellt werden. Eine Herausforderung ist hierbei häufig das ungünstige Verhältnis von großem Medientvolumen im Vergleich zur geringen Zellzahl. Dadurch werden in der Zellkultur gebildete Wachstumsfaktoren und Botenstoffe verdünnt und so die Ausbildung organotypischer Strukturen und Funktionen vermindert oder ganz unterbunden.

Ein Chip mit Herz

Abhilfe kann eine in den Chip integrierte Mikropumpe schaffen. Diese fördert ähnlich dem menschlichen Herzen Zellkulturmedium oder artifizielles Blut pulsatil durch den Chip. Ermöglicht wird dies durch den Aufbau der Pumpe, bestehend

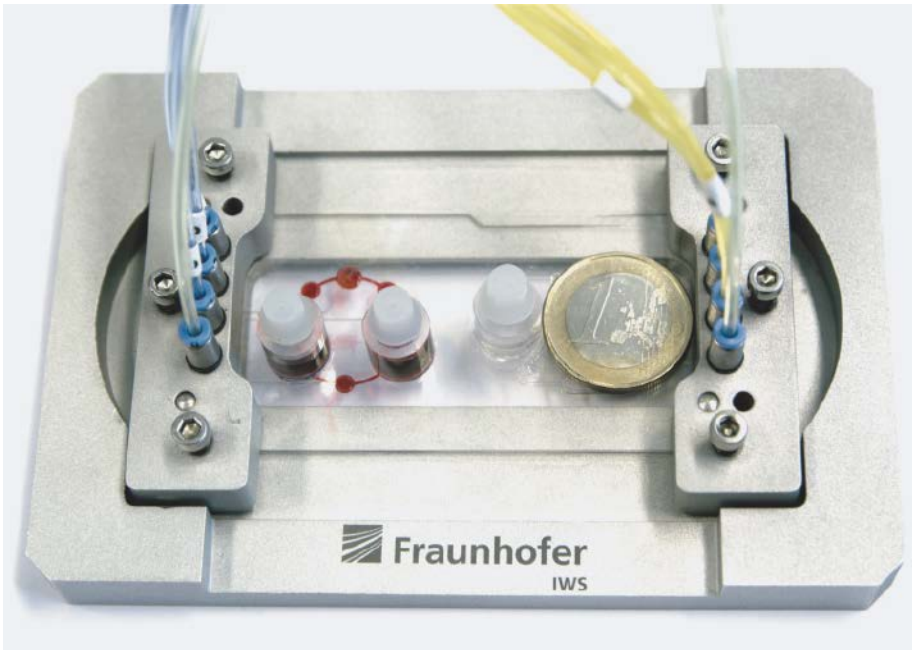


Abb. 1: Chip mit zwei separaten Mikrokreisläufen in Aufnahmevorrichtung. Pro Kreislauf je eine Mikropumpe und zwei Zellkulturkammern.“

aus einem Ein- und einem Auslassventil sowie einer Pumpkammer. Die Ventile übernehmen hierbei die Funktion der Herzklappen, die Pumpkammer die Funktion der Herzkammern. Der Antrieb der Pumpe erfolgt pneumatisch über die druckabhängige Vorwölbung von Membranen, die Bestandteil der Pumpkammer und Ventile sind. Durch eine gezielte Ansteuerung der Membranen kann eine gerichtete Strömung erzeugt werden. Über die Regulierung der Parameter Frequenz, Druck, Unterdruck und Gasvolumenstrom kann das Förderprofil der Pumpe spezifisch eingestellt und an die Physiologie angepasst werden. Die eingesetzten Membranen sind für viele Gase permeabel. Dadurch kann die Pumpe auch als Oxygenator betrieben werden und die Funktion der Lunge nachbilden. Dies ermöglicht die Einstellung der Oxygenierung des im Chip befindlichen Zellkulturmediums durch Anpassung des Sauerstoffgehalts des für den Antrieb der Pumpen eingesetzten Gases.

Maßgeschneiderte Systeme dank Multilagentechnologie

Für die schnelle, flexible und preiswerte Herstellung von LoC-Systemen wurde am Fraunhofer IWS eine geschlossene Technologieketten für den Multilagenaufbau laser-mikrostrukturierter Folien entwickelt und erfolgreich etabliert. Im ersten Schritt wird das zu fertigende Mikrofluidiksystem konstruktiv in einzelne Lagen zerlegt, die später jeweils durch eine separate Folie oder Platte realisiert werden. Ausgehend von den funktionellen Randbedingun-

gen erfolgt in einem zweiten Schritt für jede Lage die Auswahl der entsprechenden Folien bzw. Platten mit den notwendigen Eigenschaften (hydrophil, hydrophob, transparent, permeabel, porös). Im dritten Schritt werden die Folien und Platten mittels Lasermikromaterialbearbeitung beidseitig strukturiert und funktionalisiert. Das Zusammenfügen der einzelnen Folien und Platten zu einem Multilagensystem erfolgt im vierten und damit letzten Schritt wahlweise durch Verkleben, Bonden (thermisch, Plasma) oder Verschweißen (Laser-, Heizelement-, Warmgas-, Hochfrequenz-, Strahlungs- oder Reibungsschweißen). Das Einbringen von elastischen Lagen in einen Stapel ermöglicht die Realisierung von pneumatisch aktiverbaren Mikropumpen und -ventilen. Die Variation von Aufbau und Geometrie der Pumpkammern und Ventile bietet dabei die Möglichkeit die Charakteristik der Pumpen für verschiedene Anwendungsfälle einzustellen. Dadurch kann der Chip variabel an die jeweiligen biologischen Fragestellungen und Randbedingungen (Hypertonie, Hypotonie, Herzklappeninsuffizienz) angepasst werden.

Weiterhin können durch den Multilagenansatz mikrofluidische Systeme auf mehrere Ebenen verteilt werden, was mit einer Erhöhung der Funktionalität pro Chipfläche einhergeht. Durch den Einsatz von Folien und Platten mit unterschiedlichen Eigenschaften können beispielsweise die Benetzung gezielt gesteuert und Funktionen wie Kapillar-Stopp-Ventile, Barrieren oder eine gezielte Zellbesiedlung realisiert werden. Weiterhin lassen sich auch Folien und

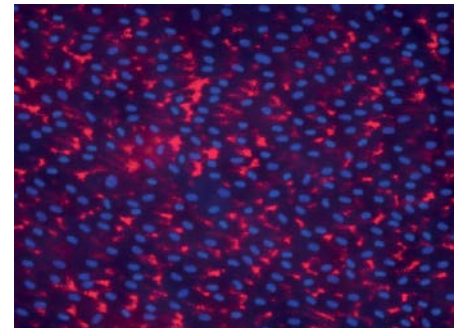


Abb. 2: Doppelt fluoreszenzgefärbte Endothelzellen nach 8 Tagen unter Perfusion (blau: Zellkerne; rot: Oberflächenmarker)

Platten mit aufgetragenen Dünnschichtelektroden integrieren, was den Einsatz elektrischer und elektrochemischer Sensoren und Aktoren ermöglicht.

Multilagensysteme aus einer Kombination von Polycarbonat- und Silikonfolien sind gegen Ethanol beständig und lassen sich somit leicht reinigen. Darüber hinaus können sie durch Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert werden.

Für eine optimale optische Zugänglichkeit sind pneumatische und elektrische Schnittstellen am Rand angeordnet, siehe Abbildung 1. Eine passende Aufnahmevorrichtung im Mikrotiterplattenformat ermöglicht die einfache Kopplung mit etablierten Laborgeräten (Mikroskope, Fluoreszenzscanner).

Steuerung und Regelung der integrierten Pumpe

Das Ansteuern der Pumpen und Ventile erfolgt mit einem kompakten Controller auf Basis eines leistungsstarken Einplatinencomputers mit Linux-Betriebssystem. Dieser stellt 24 unabhängig voneinander schaltbare, pneumatische Ausgänge bereit und ermöglicht so die Ansteuerung von bis zu acht Pumpen. Die Interaktion mit dem Nutzer erfolgt über ein 7-Zoll-Touchscreen. Weiterhin stellt der Controller zahlreiche Schnittstellen (Ethernet, USB, RS232, RS485) für die Kopplung mit Peripheriegeräten (Sensoren, Aktoren), Datenspeichern und Netzwerken bereit.

Der vollständig implementierte und erprobte Netzwerk-Stack des Linux-Kernels ermöglicht die Fernüberwachung mittels Webapplikationen auf Basis eines Webservers sowie Hypertext Transfer Protocol (HTTP) oder Hypertext Transfer Protocol Secure (HTTPS). Fernwartungszugriffe und Datenübertragungen werden über Nutzerprogramme, welche die Protokolle Secure Copy oder Secure Shell implementieren, sicher und ressourceneffizient realisiert. Die Netzwerkschnittstelle bietet weiterhin die Möglichkeit zur Kommunikation mit La-

bor-Informations-Management- und Labor-Automatonsystemen.

Die Integration von Sensoren bietet in Kombination mit dem leistungsstarken Controller eine regelungstechnische Plattform. So kann beispielsweise ausgehend von der Sauerstoffkonzentration innerhalb des LoC und einem entsprechenden Modell die notwendige Pumpgeschwindigkeit für die bedarfsgerechte Versorgung berechnet und das System so ausgeregelt werden.

Erfolgreicher Einsatz in der nephrologischen Forschung

In der Niere haben Endothelzellen - neben ihrer Rolle als fenestrierte Membran im Glomerulus – als natürliche Gefäßauskleidung eine wesentliche Bedeutung für die Versorgung des Gewebes und die Interaktion mit Blutzellen. Bei der Regeneration nach akutem Nierenversagen sind besonders die Interaktion der Endothelzellen mit Leukozyten und die damit verbundene Aktivierung des Immunsystems sowie der Blutgerinnung von wissenschaftlichem Interesse. Damit Regenerationsmechanismen des Nierenendothels in Zukunft ohne Tierversuche untersucht werden können, wurden die Kapillaren der Niere in einem LoC nachgebildet. Dieses stellt drei parallele Kreisläufe mit kleinen Volumina und integrierten Pumpen bereit. Darin können die, in gesunden und kranken menschlichen Nieren vorkommenden, kapillaren Flussverhältnisse nachgebildet werden. Durch das geringe Volumen der Kanalstruktur von nur 40 µl können die Anzahl der Zellen im LoC und somit die Kosten der Versuche gering gehalten werden. Die komplette Endothelialisierung der Innenwände des nur 100 µm breiten und 100 µm hohen Kanalsystems – als Nachstellung einer Kapillare – erfolgt mit menschlichen Endothelzellen. Durch die Perfusion wurde eine kon-

fluente Ausrichtung der Zellen erreicht, wie sie an der Innenwand von menschlichen Gefäßen ebenfalls zu beobachten ist, siehe Abbildung 2. Mit dem entwickelten System ist es möglich die Interaktion von Nierenendothelzellen mit Leukozyten oder Thrombozy-

ten zu untersuchen und so die Ursache für die Entstehung verschiedener degenerativer Nierenerkrankungen und ihrer Regenerationsmechanismen zu verstehen und damit Ansätze für neue Behandlungsmöglichkeiten zu eröffnen.

Kontakt

Dr.-Ing. Frank Sonntag
Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik IWS , Dresden
frank.sonntag@iws.fraunhofer.de
www.iws.fraunhofer.de



Mehr Informationen zum Thema:
<http://bit.ly/3DZellkultursubstrate>



Mehr Informationen:
<http://bit.ly/GIT-Fraunhofer>