

Organ-on-a-chip

Mikrofluidisches 3D-Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke

HEIKO KIESSLING¹, INGO SCHULZ², ELEONORE HALTNER³, GERT FRICKER⁴, MARTIN STELZLE¹, JULIA SCHÜTTE¹

¹NATURWISSENSCHAFTLICHES UND MEDIZINISCHES INSTITUT (NMI), UNIVERSITÄT TÜBINGEN

²MICROFLUIDIC CHIPSHOP GMBH, JENA

³ACROSS BARRIERS GMBH, SAARBRÜCKEN

⁴INSTITUT FÜR PHARMAZIE UND MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE (IPMB), UNIVERSITÄT HEIDELBERG

State of the art animal and cell culture models fail to predict the ability of drugs to cross the blood-brain barrier as they lack comparability to the complex human situation. The development of novel pharmaceuticals therefore requires *in vitro* models with human like cell response. Therefore, we are developing a model which mimics the organ environment including the specific 3D arrangement of different cell types, extracellular matrix, and perfusion by combining biology, biochemistry and microfluidic technology.

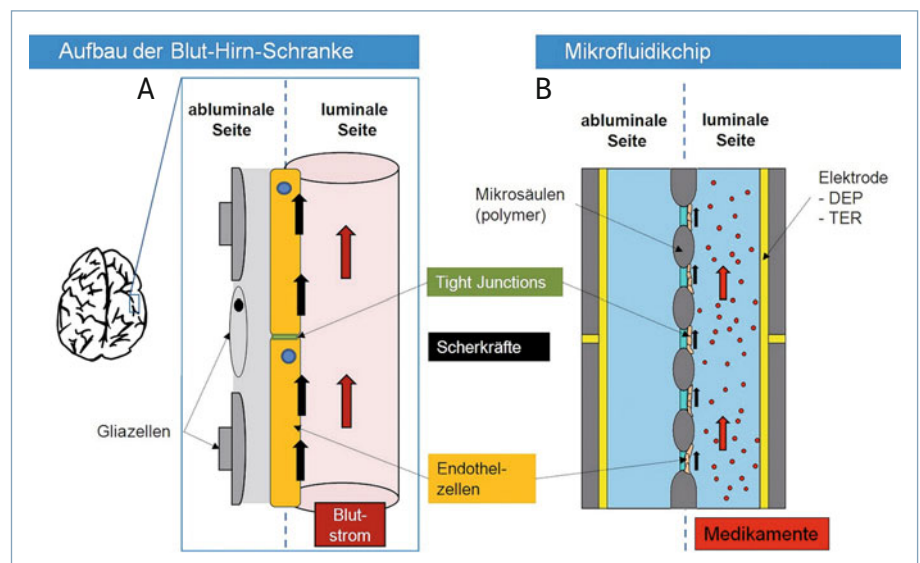
DOI: 10.1007/s12268-015-0558-y
© Springer-Verlag 2015

■ Noch immer stellt die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie z. B. Alzheimer, eine große Herausforderung dar. Nur wenige Wirkstoffe können ihren Zielort im Gehirn erreichen, da sie nicht über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden. Diese ist eine Barriere aus dicht miteinander verbundenen Endothelzellen, die das Gehirn vor dem Eindringen von Fremdstoffen wie Toxinen schützt, aber eben auch den Übertritt von Wirkstoffen aus dem Blut in das Gehirn verhindert. Die Untersuchung dieser Vorgänge und die Entwicklung Blut-Hirn-Schranke-gängiger Wirkstoffe wird durch das Fehlen hinreichend human-ähnlicher Modelle erschwert. Derzeit werden neue Medikamente überwiegend in Tieren oder einfachen Zellkulturmodellen auf ihre Blut-Hirn-Schranke-Gängigkeit untersucht. Tiermodelle wie Mäuse, Ratten, Hunde oder Schweine sind jedoch nur bedingt vergleichbar mit der Situation im Menschen und auch ethisch fragwürdig. Zellkulturmodelle, welche zumeist aus einer porösen Membran und einem dar-

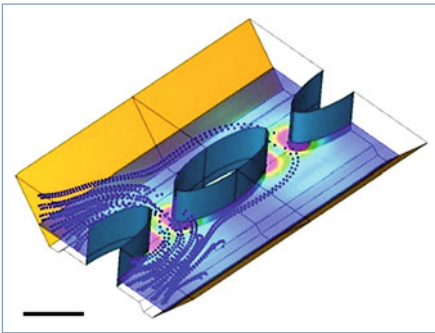
auf kultivierten Zellmonolayer bestehen, sind aufgrund mangelnder Komplexität, nur bedingt aussagekräftig in Bezug auf das Verhalten neuer Wirkstoffe im Menschen [1]. Um diese Limitationen zu überwinden, werden neue Modelle entwickelt, welche die Komplexität von Organen in dreidimensionalen und Organ-ähnlichen Zellkultursystemen nachahmen.

Organ-ähnliche Zellkulturmodelle, Modelle der Blut-Hirn-Schranke

Wenn Zellen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung kultiviert werden, verlieren sie meist schon nach wenigen Stunden bis Tagen wichtige zellspezifische Funktionen, sie dedifferenzieren. Neuere Entwicklungen versuchen daher, die natürliche Umgebung der Zellen im Organ möglichst genau zu imitieren und somit die Ausbildung bzw. den Erhalt des natürlichen Phänotyps zu begünstigen. So wurde bereits gezeigt, dass die Einwirkung



▲ **Abb. 1:** Gegenüberstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke und der Umgebungsbedingungen im Mikrofluidik-Chip. **A,** Scherkräfte, die auf die Zellen im Blutgefäß wirken, sollen die Ausprägung des charakteristischen Phänotyps der Endothelzellen unterstützen. **B,** Zwei parallel laufende Mikrokanäle werden durch die Zellbarriere getrennt und bilden somit eine „Blut-“ und eine „Hirnseite“ aus. An den Außenwänden der Kanäle befinden sich Goldelektroden für die dielektrophoretische Assemblierung von Zellen zwischen den Mikrosäulen, wo sie an einer *in situ* aufgebauten Stützmembran adhären. DEP: Dielektrophorese; TER: Transepithelischer Widerstand



▲ **Abb. 2:** Simulation der zwischen den Mikrosäulen assemblierenden Zellen (blaue Punkte). Aufgrund der Isolatorstruktur (ovale Mikrosäulen aus Kunststoff) entsteht bei Anlegen einer Wechsellspannung eine inhomogene Feldverteilung. Bewegen sich Zellen im Medium durch den Mikrofluidikkanal werden diese polarisiert und erfahren eine auf sie wirkende dielektrophoretische Kraft, welche in Richtung der maximalen Feldinhomogenität (violett dargestellt) wirkt. Maßstabsbalken: 300 μm .

von Scherkräften während der Kultivierung zu einer verbesserten Ausbildung der charakteristischen Form von Endothelzellen führt [2]. Ebenso prägen sich die für die Blut-Hirn-Schranke typischen undurchlässigen Zell-Zell-Kontakte (Tight Junctions) zwischen den Endothelzellen besser aus, wenn diese in einer Ko-Kultur mit weiteren Zellen des Gehirns, wie Astrozyten oder Perizyten [3],

kultiviert werden. Zudem spielt die Art der verwendeten Endothelzellen eine wichtige Rolle. Da primäre humane Zellen nur begrenzt verfügbar sind, werden meist immortalisierte Zelllinien verwendet. In neueren technischen Entwicklungen versucht man einlagige Membranmodelle durch gestapelte Ko-Kulturen zu erweitern [4, 5] oder die Struktur von Kapillargefäßen durch Hohlfasern zu imitieren, an denen die Endothelzellen adhären und kultiviert werden [6]. Erste Ansätze nutzen die Perfusion der Zellkultur durch Mikrokanäle, um Scherkräfte nachzubilden [7, 8].

Kombination von Mikrofluidik und Dielektrophorese als generisches Prinzip für 3D-Modelle

Am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) an der Universität Tübingen werden derzeit Zellkulturmodelle in mikrofluidischen Strukturen realisiert, in denen organotypische Zellen mittels dielektrophoretischer Kräfte in der für das betreffende Organ typischen Struktur angeordnet werden (**Abb. 1**). Dielektrophorese basiert auf der elektrischen Polarisierung von Zellen in einem inhomogenen elektrischen Hochfrequenzfeld. Da nur vitale Zellen einen Kontrast zwischen Intra- und Extrazellulärmedium zeigen, werden selektiv nur vitale Zellen aus der in das Mikrosystem eingebrachten Zellsuspension in das Mikroorgan assembliert. Auf

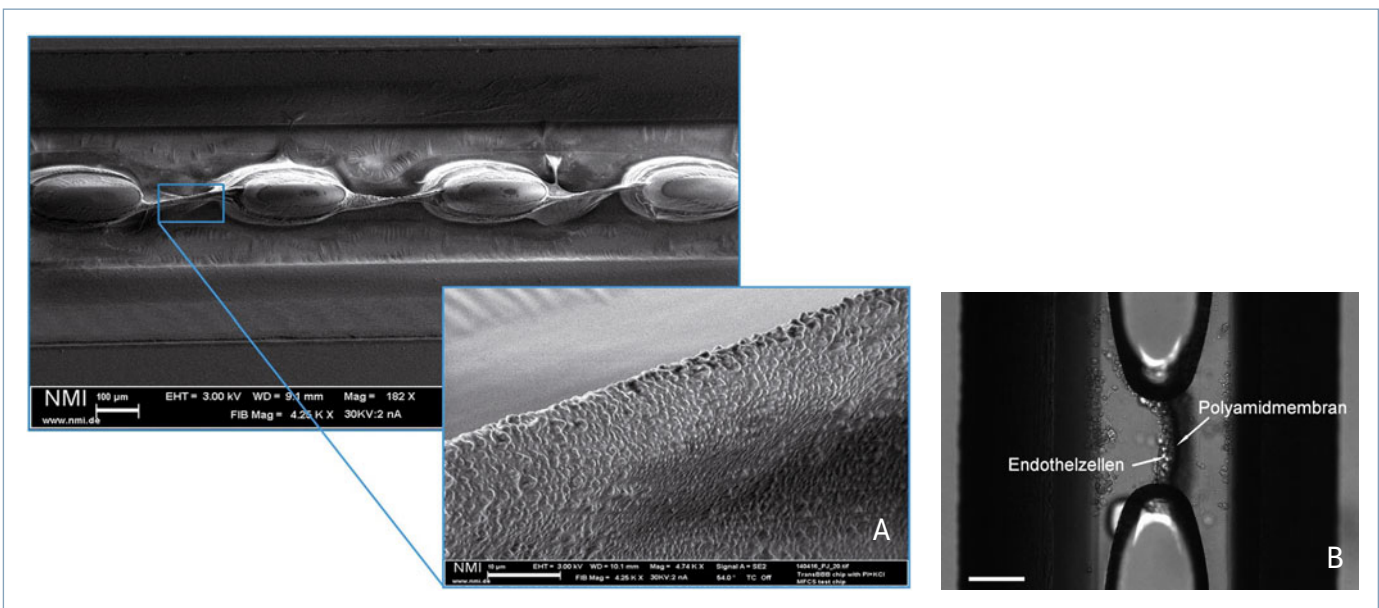
diese Weise wird eine hohe Homogenität in der Zellqualität erreicht [9]. Die resultierende Anordnung der Zellen ist durch die Gestaltung der 3D-Topologie des Mikrofluidiksystems per Design determinierbar.

Der Einsatz dieser Techniken in Verbindung mit Mikrofluidik ist als generisches Prinzip zur Herstellung von 3D-Zellkulturen zu verstehen. Abhängig von der Gestaltung der Isolatorstrukturen zwischen den Elektroden können unterschiedlich geformte Feldgradienten erzeugt werden [10, 11]. An den Stellen der größten Feldinhomogenität werden Zellen assembliert.

Im Fall der Blut-Hirn-Schranke sollte eine vertikale Zellmembran mittig zwischen zwei parallel laufenden Mikrokanälen aufgebaut werden. Hierzu wurden ovale Mikrosäulen in den spritzgegossenen Chip vorgesehen, welche wie der Chip selbst aus einem Cycloolefin-Ko-Polymer (COC) bestehen. Diese wurden so gestaltet, dass die Endothelzellen zwischen den Säulen assembliert werden (**Abb. 2**).

In situ-Membranen als Stützmatrix in Mikrofluidik-Chips

Um die Adhäsion der Zellen im Chip auch nach der Assemblierung zu gewährleisten, wird zuvor eine Stützmatrix zwischen den Mikrosäulen aufgebaut. Diese wird anschließend mit Proteinen der Extrazellulärmatrix beschichtet, welche die Basallamina der Blut-Hirn-Schranke imitieren. Die Wahl des Mate-



▲ **Abb. 3:** In situ polymerisierte Polyamidmembran im Mikrofluidik-Chip. **A**, Die Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen zeigen die Polyamidmembran zwischen den Polymersäulen des Mikrofluidik-Chips. Die Membran wird mit extrazellulären Matrixproteinen beschichtet und stützt die Zellen nach der Zelladhäsion zwischen den Säulen. **B**, Auch mit bereits integrierter Stützmembran lassen sich Endothelzellen zwischen den Säulen dielektrophoretisch assemblieren. Maßstabsbalken: 100 μm (A), 200 μm (B).

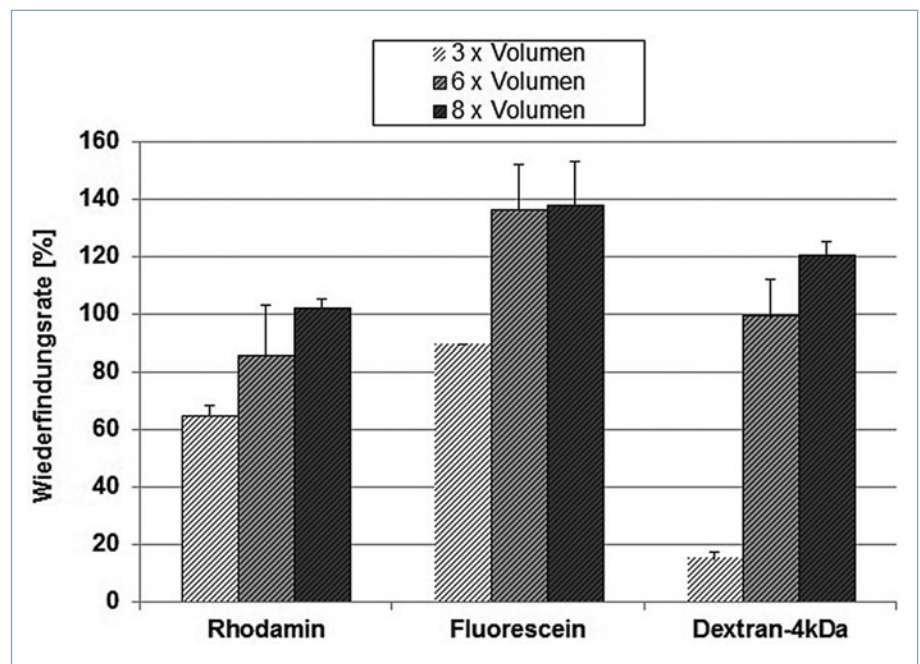
rials der Membran spielt beim Aufbau des Modells eine wichtige Rolle. Eine Membran aus Polyamid lässt sich mittels Zweiphasen-Polykondensation im laminaren Fluss zwischen den Mikrosäulen aufbauen und bildet eine ca. zehn Mikrometer dicke, poröse Stützmatrix (**Abb. 3A**). Diese Membran ist permeabel und zellverträglich. Nach dem Aufbau der Stützmembran können Endothelzellen (**Abb. 3B**) im Chip assembliert werden. Während der Kultivierung wird der Chip mittels eines Heizglases auf 37 °C temperiert.

Permeabilitätsmessungen in mikrofluidischen Systemen

Wegen des großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses in den Mikrokanälen und Schläuchen von mikrofluidischen Systemen stellt der Umgang mit Testsubstanzen oft eine Herausforderung dar. Besonders kleine, hydrophobe Moleküle können an die hydrophoben Kanalwände des Polymerchips binden, wodurch sie für einen Permeabilitätstest verloren sind. Daher ist eine Messung eines möglichen Substanzverlusts im System unverzichtbar. **Abbildung 4** zeigt eine Messung der Wiederfindungsrate im System von drei Substanzen, welche häufig als Standards zur Überprüfung der Dichte von Barriere-Zellkulturen verwendet werden.

Hoher Bedarf an neuen *in vitro*-Modellen

Angesichts der zunehmenden Zahl an Erkrankungen des zentralen Nervensystems, insbesondere von Demenzerkrankungen [12], und



▲ **Abb. 4:** Die Wiederfindungsraten von Rhodamin, Fluorescein und einem Dextran (4 kDa) wurden bestimmt, indem ein Vielfaches des Systemvolumens (Chip + Zuleitungen) durch das mikrofluidische Setup gepumpt wurde. Aus dem Effluent wurde die Konzentration der Substanzen bestimmt und mit der eingespülten Konzentration verglichen.

den noch unzureichenden, in der präklinischen Entwicklung neuer Wirkstoffe einsetzbaren Testverfahren lässt sich ein hoher Bedarf an fundamental verbesserten *in vitro*-Modellen ableiten. 3D- und Organ-ähnliche Zellkulturmodelle bieten hier im Vergleich zu konventionellen Membranmodellen entscheidende Vorteile, sodass es nur eine Fra-

ge der Zeit zu sein scheint, bis sich diese auf dem Markt etablieren werden. ■

Literatur

- [1] Partridge WM (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRX* 2:3–14
- [2] Bussolari SR, Dewey CF (1982) Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev Sci Instrum* 53:1851–1854

- [3] Cohen-Kashi Malina K, Cooper I, Teichberg VI (2009) Closing the gap between the *in-vivo* and *in-vitro* blood-brain barrier tightness. *Brain Res* 1284:12–21
- [4] Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L et al. (1999) *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36:165–178
- [5] Li G, Simon MJ, Cancel LM et al. (2010) Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: *in vitro* blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Ann Biomed Eng* 38:2499–2511
- [6] Cucullo L, Marchi N, Hossain M et al. (2011) A dynamic *in vitro* BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:767–777
- [7] Yeon JH, Na D, Choi K et al. (2012) Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures. *Biomed Microdevices* 14:1141–1148
- [8] Schütte J, Stelzle M (2011) Artificial microorgans: a microfluidic tool for *in vitro* assessment of toxicity. *Bioanalysis* 3:2373–2375
- [9] Crane JS, Pohl HA (1968) A study of living and dead yeast cells using dielectrophoresis. *J Electrochem Soc* 115:584
- [10] Schütte J, Hagemeyer B, Holzner F et al. (2011) “Artificial micro organs” – a microfluidic device for dielectrophoretic assembly of liver sinusoids. *Biomed Microdevices* 13:493–501
- [11] Schütte J, Freudigmann C, Benz K et al. (2010) A method for patterned *in situ* biofunctionalization in injection-molded microfluidic devices. *Lab Chip* 10:2551–2558
- [12] Wortmann M (2012) Dementia: a global health priority-highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther* 4:40

Korrespondenzadresse:

Heiko Kiessling
Dr. Martin Stelzle
Naturwissenschaftliches und Medizinisches
Institut (NMI)
Universität Tübingen
Markwiesenstraße 55
D-72770 Reutlingen
Tel.: 07121-51530-832 (H. Kiessling),
-75 (M. Stelzle)
Fax: 07121-51530-16
heiko.kiessling@nmi.de
martin.stelzle@nmi.de
www.nmi.de

ARBEITSGRUPPE

Am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) der Universität Tübingen werden in der Arbeitsgruppe BioMEMS und Sensorik (Leitung: Martin Stelzle) 3D-*in vitro*-Modelle für die Erprobung von Wirkstoffen entwickelt. In diesem Zusammenhang wird im Rahmen des durch das BMBF geförderten Projektes „TransBBbarrier“ (Förderkennzeichen: 16SV5952) in Zusammenarbeit mit den Partnern von microfluidic ChipShop und Across Barriers, beide Jena, sowie dem Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg ein neuartiges Membranmodell der Blut-Hirn-Schranke entwickelt.