

# Mikropartikel-Basierte Sauerstoff- und pH-Wert-Messung für die Lokale Echtzeitanalyse des Zellmetabolismus für In-Vitro-Testsysteme

Katja Uhlig<sup>1</sup>, Christian Gehre<sup>1</sup>, Maike Stahl<sup>1</sup>, Sebastian Prill<sup>1</sup>, Elmar Schmäzlin<sup>2</sup>, Christian Funk<sup>3</sup>, Lars Dähne<sup>3</sup>, Claus Duschl<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Potsdam, Deutschland

<sup>2</sup>Colibri Photonics GmbH, Potsdam, Deutschland

<sup>3</sup>Surflay Nanotec GmbH, Berlin, Deutschland

Katja.Uhlig@izi-bb.fraunhofer.de

## Zusammenfassung

Lebende Zellverbände in künstlichen Umgebungen sind für wissenschaftliche und medizinische Testsysteme essentiell. Sie werden für die Bewertung von Pharmaka, Chemikalien und Kosmetika im Hinblick auf deren Toxizität eingesetzt. Bei der Forschung an neuen Therapieansätzen dienen sie als Tierversuchersersatz, d. h. als in-vitro-Testsysteme.

Um die Toxizität und Wirkungsmechanismen von Testsubstanzen mit Zellmodellen analysieren und bewerten zu können, müssen geeignete Messmethoden für die Bestimmung aussagekräftiger Parameter entwickelt werden. Die meisten Zelltests basieren auf Endpunktmessungen, die zudem keine lokale Auflösung bieten. Dieses limitiert inhärent die Aufklärung spezifischer Wirkstoffmechanismen. Vor kurzem demonstrierten wir, dass die metabolische Aktivität von Leberzellen mit optisch auslesbaren mikroskopischen Sensorpartikeln in Echtzeit verfolgt werden kann.

In diesem Zusammenhang stellen wir hier einen Bioreaktor vor, in dem Leberzellen unter nahezu physiologischen Bedingungen kultiviert werden können. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen verändert die Sauerstoffkonzentration, die mit optischen partikelbasierten Mikrosensoren in Echtzeit bestimmt wurde. Darüber hinaus führten wir erste Echtzeit-pH-Wertmessungen mit optischen partikelbasierten Mikrosensoren durch. Beide Sensorsysteme haben die entscheidenden Vorteile, dass sie nicht-invasiv und einfach zu verwenden sind, sowie aufgrund ihrer mikroskopischen Größe eine hohe örtliche Auflösung ermöglichen.

**Keywords:** Bioreactor, liver on chip, organ-on-a-chip, oxygen uptake, pharma screening

## Einleitung

Das toxikologische Potential von Chemikalien wie Körperpflegemitteln und Pharmazeutika muss bestimmt und als sicher bestätigt werden, um Nebenwirkungen und Überdosierungen auszuschließen. Daher ist eine systematische Bewertung potenziell schädlicher Wirkungen vor dem Markteintritt unumgänglich. In der Europäischen Union beispielsweise wird die Chemikaliensicherheit durch die REACH-Verordnung geregelt. Da die Regularien für die Generierung der experimentellen Daten zunehmend den Einsatz von Tierversuchen einschränken bzw. untersagen, müssen Alternativen entwickelt werden. Um die Komplexität eines Organismus oder von Organen zu imitieren, steht die

Entwicklung von *in-vitro*-Modellen in mikrofluidischen Systemen im Fokus der Forschung. Die meisten *in-vitro*-Testverfahren basieren in der Regel auf Endpunktmessungen und geben daher nur eingeschränkt Aufschluss über die Kinetik der Toxizität und den Wirkungsmechanismus.

Eine Herausforderung bei der Echtzeitmessung ist die Implementierung einer geeigneten Sensorik, die minimalen Einfluss auf das Zellsystem hat und das Quantifizieren der metabolischen Aktivität der Zellen ermöglicht. Der Stoffwechsel kann z. B. über die Konzentration von Edukten wie Sauerstoff als Bestandteil der Zellatmung oder über die pH-Wertänderung als Folge der Akkumulation von Stoffwechselprodukten gemessen werden. Für beide Messgrößen sind partikelbasierte,

optische Sensoren verfügbar, die sich für die Integration in Zellsysteme eignen und über Fluoreszenzmikroskopie auslesen werden können.

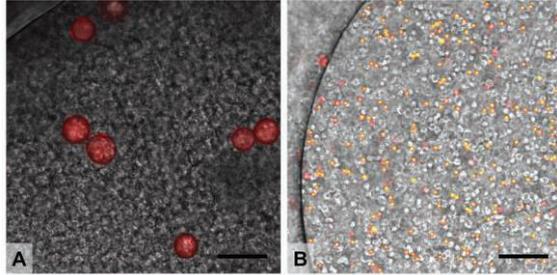


Abb. 1: A) Überlagerung einer Phasenkontrastaufnahme und Fluoreszenzaufnahme von Hepatozyten und  $O_2$ -Sensorpartikeln (rot) im Mikroreaktor. B) Überlagerung einer Phasenkontrastaufnahme und Fluoreszenzaufnahmen von Epithelzellen und den pH-Sensorpartikeln (HPTS: grün, Nilblau: rot, Überlagerung: gelb). Beide Zelllinien wurden in eine Kollagenmatrix eingebettet. Die Maßbalken entsprechen  $100\ \mu\text{m}$ .

1.) Colibri Photonics GmbH hat Sauerstoffsensoren entwickelt, deren Messprinzip auf die Änderung der Phosphoreszenzlebenszeit eines Ruthenium-Farbstoffs durch Quenching in Anwesenheit von Sauerstoff basiert [1]. Die Partikel bestehen aus einer Polystyrenmatrix und sind  $50\ \mu\text{m}$  groß. Wir haben diese Sensoren in einen Mikroreaktor für die Kultivierung von Leberzellen (Hepatozyten) integriert, um den Sauerstoffverbrauch bei Exposition gegenüber unterschiedlichen Pharmaka (hier exemplarisch Acetaminophen) zu quantifizieren und daraus die  $TC_{50}$ -Werte zu bestimmen [2,3].

2.) Surflay Nanotec GmbH entwickelt optische pH-Sensorpartikel. Diese  $9\ \mu\text{m}$  großen sphärischen Partikel bestehen aus Melamin-Formaldehyd und sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen beladen. Die Fluoreszenzintensität des Sensorfarbstoffs HPTS (8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure) ist pH-Wert-abhängig. Die Fluoreszenzintensität des Referenzfarbstoffs Nilblau ist im sauren und neutralen Milieu pH-Wert-unabhängig. Die pH-Sensoren wurden charakterisiert, kalibriert und hier erstmals für *in-vitro*-Anwendungen getestet.

### Ergebnisse und Diskussion

Ein großer Vorteil der partikelbasierten Sensorsysteme ist die einfache Integrierbarkeit in das Zellgewebe. Wir haben die Partikel zusammen mit zwei unterschiedlichen Zelltypen in einer Kollagenmatrix eingebettet

und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 1).

### Sauerstoff-Sensoren

Als Maß für die metabolische Aktivität von Hepatozyten in *in-vitro*-Toxizitätsmessungen wurden die  $O_2$ -Sensoren verwendet. Das Zell-Partikel-Gewebe wurde in kleinen Kavitäten eines mikrofluidischen Bioreaktors eingebettet und kontinuierlich mit Medium versorgt. Beispielhaft ist in Abb. 2 eine Echtzeitsauerstoffmessung von Hepatozyten während einer Exposition gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen Acetaminophen (Paracetamol) dargestellt. Dieses Medikament führt bei Überdosierung zu akutem Leberversagen. Die Flussrate des mit Sauerstoff gesättigten Mediums wurde initial so gewählt, dass der mit dem im Kulturmedium strömende Sauerstoff von den Zellen bis auf 5 % verbraucht wurde. Nach Zugabe von 8, 12,5 und 16 mM Acetaminophen stieg die Sauerstoffkonzentration im Reaktor an (Abb. 2). Die Zellen metabolisierten folglich weniger Sauerstoff durch die Medikamentenzugabe. Die Änderung des Sauerstoffverbrauchs verläuft in zwei Phasen: In der ersten Phase stieg die Sauerstoffkonzentration innerhalb der ersten drei Stunden nach Zugabe schnell an. Hier reagierten die Zellen direkt auf das Acetaminophen. In der zweiten Phase stieg die Sauerstoffkonzentration langsamer an. Dies ist ein Hinweis auf das Entstehen des toxischen Metaboliten *N*-Acetyl-*p*-Benzo-quinonimin (NAPQI) [2].

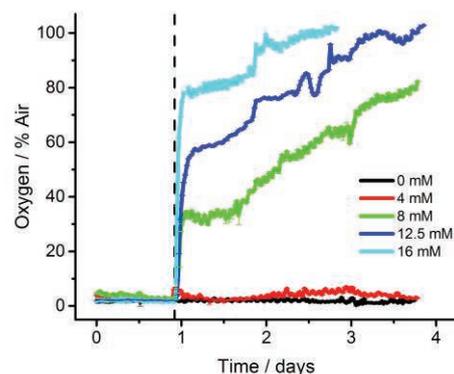


Abb. 2: Echtzeitsauerstoffmessungen mittels  $O_2$ -Sensorpartikel im Mikroreaktor mit Hepatozyten. Die Leberzellen wurden unterschiedlichen Konzentrationen von Acetaminophen ausgesetzt und die Sauerstoffkonzentration in dem Zellgewebe als Maß für den Zellmetabolismus bestimmt.

### pH-Sensoren

Da die pH-Sensorpartikel erstmals für Zellkulturanwendungen eingesetzt wurden, wurde der dynamische Messbereich der pH-Sensoren überprüft und eine Kalibrierfunktion mit dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt (Abb. 3). Die Fluoreszenzintensitäten von HPTS und Nilblau wurden systematisch in einem pH-Bereich von 4,1 bis 7,7 gemessen. Die Fluoreszenzintensität des Sensorfarbstoffs HPTS nahm exponentiell mit steigendem pH-Wert ab, während die Intensität des Referenzfarbstoffs Nilblau in dem gemessenen pH-Bereich konstant blieb. Aus dem Quotienten der beiden Fluoreszenzintensitäten wurde eine Exponentialfunktion für die Bestimmung des pH-Werts ermittelt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Sensorpartikel über 100 Messungen photostabil sind und dass die pH-Wertbestimmung durch die Verwendung des Referenzfarbstoffs fokusunabhängig ist, sofern die Fluoreszenz detektiert werden kann.

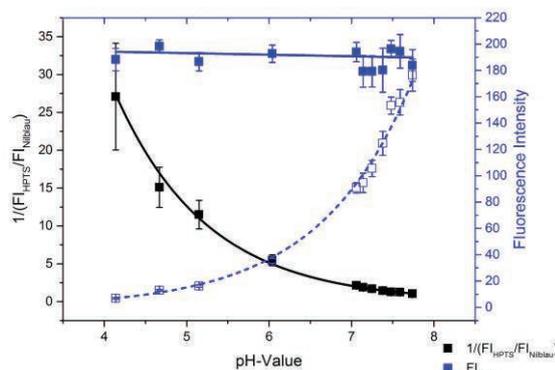


Abb. 3: Kalibrierung der pH-Sensorpartikel mittels Fluoreszenzmikroskop. Die Fluoreszenzintensität von Nilblau  $F_{\text{Nilblau}}$  (blaue, gefüllte Quadrate;  $E_x=590\text{--}650\text{ nm}$ ,  $E_m=663\text{--}737\text{ nm}$ ) und von HPTS  $F_{\text{HPTS}}$  (blaue, offene Quadrate;  $E_x=467\text{--}498\text{ nm}$ ,  $E_m=513\text{--}556\text{ nm}$ ) wurde bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt und anschließend als  $1/(F_{\text{HPTS}}/F_{\text{Nilblau}})$  dargestellt. Eine Exponentialfunktion wurde an diese Werte gefittet.

Um den Einfluss der Stoffwechselprodukte von Zellen auf den pH-Wert zu quantifizieren, wurden CHO-K1-Epithelzellen unter statischen Bedingungen, also ohne kontinuierliche Nährstoffversorgung, kultiviert. Die pH-Sensorpartikel wurden wie die  $O_2$ -Sensoren in Kavitäten eines Zellkulturträgers eingebracht. In benachbarten Kavitäten wurden Sensorpartikel ohne Zellen in Kollagen eingebettet (Kavitäten: Durchmesser: 1,5 mm, Abstand: 2 mm). Der gesamte Zellkulturträger

wurde mit Medium überschichtet, so dass alle Kavitäten durch das Medium verbunden wurden. Der pH-Wert wurde mittels Sensorpartikel für 48 Stunden innerhalb (Kavität mit Zellen) und außerhalb des Zellgewebes (Kavität ohne Zellen) gemessen (Abb. 4). Innerhalb der ersten 15 Stunden sank der pH-Wert in Zellnähe rapide auf ein Minimum von pH 6 ab, infolge der Akkumulation von Stoffwechselprodukten. Anschließend stieg der pH-Wert langsam an (nicht signifikant). Im Gegensatz dazu sank der pH-Wert im Medium kontinuierlich ab. Am Ende der Messung wurde durch eine Zellfärbung festgestellt, dass nahezu alle Zellen im Verlauf des Experiments abgestorben waren. Die Ursache war vermutlich ein lokaler Nährstoffmangel. Anhand der Echtzeitbestimmung des pH-Werts kann abgeleitet werden, dass ein Großteil der Zellen nach 15 Stunden ihren Stoffwechsel einstellten. Wird der pH-Wert im Medium als Indikator analysiert, kann der Zeitpunkt des Zelltods nicht ermittelt werden, da der pH-Wert durch Diffusion der Stoffwechselprodukte kontinuierlich sinkt. Durch die partikelbasierte lokale pH-Wertbestimmung im Zellgewebe können also wesentlich mehr Informationen über den Status der Vitalität gewonnen werden.

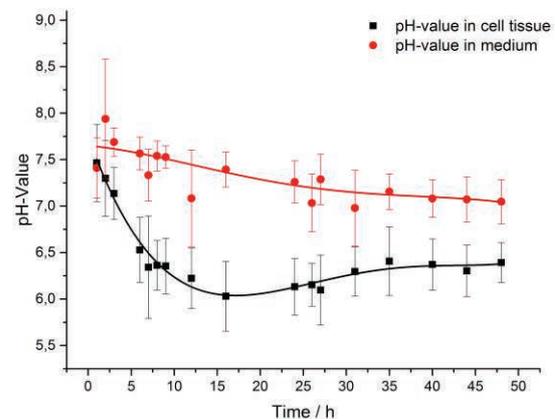


Abb. 4: Echtzeit-pH-Messungen mittels optischer Sensorpartikel in einer dreidimensionalen Zellmatrix. Der pH-Wert wurde in Zellnähe innerhalb des Zellgewebes bestimmt (schwarze Quadrate). In den ersten 15 Stunden sank der pH-Wert auf ein Minimum von pH 6 ab und stieg anschließend wieder geringfügig an. Die Messung im Medium (rote Kreise) zeigten jedoch kontinuierlichen Abfall des pH-Werts. Die durchgezogenen Linien dienen der Anschaulichkeit.

### Zusammenfassung und Ausblick

Der Zellmetabolismus konnte mittels partikelbasierter optischer Sensoren zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration und des pH-Werts in Echtzeit erfolgreich analysiert werden. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass lokale Messungen unmittelbar an den Zellen den Stoffwechsel der Zellen präziser abbilden als eine Messung im weit davon entfernten Medium.

Das nächste Ziel ist, auch die pH-Sensorpartikel in den Bioreaktor zu überführen, Toxizitätsmessungen mit relevanten Zellmodellen wie primären Hepatozyten durchzuführen und die Daten mit Sauerstoffmessungen zu korrelieren. Ferner steht die Automatisierung und Parallelisierung der Sauerstoffmessungen für *in-vitro*-Toxizitätsmessungen im Mikroreaktor im Fokus.

### Literaturnachweis

- [1] C. Ast, E. Schmäzlin, HG. Löhmannsröben, JT. van Dongen (2012), *Sensors* 12(6), 7015–7032 (2012); doi:10.3390/s120607015
- [2] S. Prill, D. Bavli, G. Levy, E. Ezra, E. Schmäzlin, M.S. Jaeger, M. Schwarz, C. Duschl, M. Cohen, Y. Nahmias, *Arch Toxicol.* 90(5), 1181-91 (2016); doi: 10.1007/s00204-015-1537-2
- [3] D. Bavli, S. Prill, E. Ezra, G. Levy, M. Cohen, M. Vinken, J. Vanfleteren, M.S. Jaeger, Y. Nahmias, *PNAS* 113(16), E2231–E2240 (2016) doi: 10.1073/pnas.1522556113