

Chips statt Mäuse: Zellen auf bioelektronischen Sensorchips als Alternative zu Tierversuchen

Angela M. Otto, Martin Brischwein, Elena Motrescu, Eléonore Cabala, Helmut Grothe, Christoph Stepper und Bernhard Wolf

Heinz-Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität D-München

Zusammenfassung

Ein alternatives Testverfahren zum Ersatz von Tierversuchen sollte die spezifischen mikrophysiologischen Anforderungen der Zellen bedienen und auf eine multiparametrische funktionelle Signalerfassung angelegt sein. Dafür bietet sich ein Testsystem an, dessen Kernelemente biokompatible elektronische Sensorchips sind. Es ist mit einer Einrichtung für Mediumperfusion gekoppelt, die es erlaubt, die Zugabe von Nährstoffen und Testsubstanzen und die Abführung des Kulturmediums zu kontrollieren. Die Chips sind mit Sensoren ausgestattet, mit denen grundlegende metabolische und membranassoziierte Veränderungen an lebenden Zellen kontinuierlich erfasst werden: pH-ISFETs für extrazelluläre Ansäuerung, amperometrische O₂-Sensoren für den Sauerstoffverbrauch, und IDEs für die elektrische Impedanz des Zellverbandes. Versuche mit LS174T-Kolonkarzinom-Zellen in Kultur zeigen die metabolischen und elektrischen Veränderungen bei Inkubation mit Cytochalasin B und Chloroacetaldehyd. Es gibt verschiedene Signalmuster die auf unterschiedliche Wirkmechanismen der Testsubstanzen hinweisen. Mit diesem Testsystem ist es möglich, die Wirkung unbekannter Substanzen und Gemische nachzuweisen und diese über längere Zeit an einer Zellprobe zu verfolgen.

Summary: Chips instead of mice: Cells on bioelectronic sensor-chips as an alternative to animal experiments

An alternative assay for replacing animal experiments should serve the specific microphysiological needs of the cells and be endowed with multiparametric signal monitoring. These requirements are provided by a test system in which the key elements are biocompatible electronic sensor-chips. It is also connected to a medium perfusion set-up, which allows to control the supply of nutrients and test compounds, and the removal of culture medium. The chips are equipped with sensors that continuously monitor basic metabolic parameters and membrane-associated changes of living cells: pH-ISFETs for extracellular acidification, amperometric O₂-sensors for oxygen consumption, and IDEs for electrical impedance of the cell layer. Experiments with LS174T colon carcinoma cells in culture show the metabolic and electrical changes upon incubation with Cytochalasin B and chloroacetaldehyde. The signal patterns vary and indicate different mechanisms of action for these test compounds. With this test system it is possible to detect effects of unknown substances and mixtures, and to analyse the cellular probe for prolonged times.

Keywords: bioelectronic chips, membrane properties, metabolism, microphysiology, substance detection

1 Einleitung und Fragestellung

Der Nachweis biologischer Effekte von Wirkstoffen an lebenden Zellen und Organismen ist elementarer Bestandteil von pharmazeutischen Screening-Verfahren, der toxikologischen und präklinischen Testung sowie von Chemosensitivitätstests in der Klinik. Insbesondere Versuche an Tieren bieten ein breites Spektrum an Informationen zur Wirkung der Testsubstanz, da im Organismus die Mikroumgebung der Zellen und die Wechselwirkung mit unterschiedlichen

Zellsystemen berücksichtigt wird. Im Tierversuch kommen zudem systemische Wirkungen eines Medikaments oder toxischen Agens zum Tragen, wie sie in der Zellkultur nur unzureichend nachvollzogen werden können. Allerdings sind die spezifischen (mikro-)physiologischen Bedingungen, die zur Wirkung beitragen, naturgemäß schwieriger zu erkennen und zu kontrollieren, und die Anzahl der Tiere in einem Versuch bleibt beschränkt. Bei der Suche nach adäquaten Alternativen besteht daher das Problem, physiologische Parameter eines

Organismus im gewissen Umfang nachzuahmen. Ein zentraler Aspekt dabei ist die Wahl und Aussagekraft der gewählten biologischen Testsysteme, wobei die Relevanz der Modellorganismen, die Anzahl der in einem Ansatz benötigten Organismen und die damit verbundenen Kosten entscheidende Faktoren sind. Der Einsatz von Zellkulturen macht eine fast unbeschränkte Zahl an Testansätzen möglich, und das Spektrum an kontrollierbaren Bedingungen bleibt überschaubar. Jedoch bleibt die erhaltene Information beschränkt auf die spezifi-

schen Charakteristika des jeweiligen Zelltyps. Zudem wird in der Regel nur ein biologischer Parameter als Indikator für die biologische Wirkung untersucht, und das Testverfahren erfordert die irreversible Schädigung bzw. den Tod der Zellen.

Trotz der Vielzahl an mikrophysiologischen Einflüssen, die auf Zellen einwirken und dort je nach Zelltyp spezifische Reaktionen hervorrufen, gibt es einige grundlegende Prozesse, mit denen alle Zellen reagieren: Veränderungen in der Zellmembran mit dem assoziierten Zytoskelett und Anpassungen des Energiestoffwechsels (Abb. 1).

Jedes extrazelluläre Signal wirkt sich auf die Zellmembran aus und verändert dort deren elektrische Eigenschaften. Dies ist einerseits bedingt durch Änderungen im Membranpotenzial, z.B. aufgrund von geöffneten Ionenkanälen. Andererseits treten morphologische Veränderungen ein, bedingt durch Umordnung von Zytoskelettelementen, von Zell-Zell- und/oder von Zell-Matrix-Kontakten, welche die passiven elektrischen Eigenschaften des Zellverbandes bestimmen (Abb. 1). Diese Eigenschaften können mittels

Impedanzmessungen in Zellkultur erfasst werden.

Zwischen dem anfänglichen Signal und der Expression der Funktion passen die Zellen ihren Energiemetabolismus an die biochemischen Erfordernisse an. Das heißt z.B., dass mehr ATP für Phosphorylierungsreaktionen benötigt wird, dass anabolische Prozesse wie die Synthese neuer Proteine oder die DNS-Synthese angekurbelt werden, oder auch dass bestimmte biochemische Prozesse durch physiologische oder toxische Inhibitoren gedrosselt werden. Für die ATP-Produktion spielen zwei miteinander vernetzte Stoffwechselwege eine zentrale Rolle: die Glykolyse und die Atmungskette. Der Energiemetabolismus führt zum Ausscheiden von Säuren; deshalb bedingt eine Erhöhung des ATP-Bedarfes der Zelle zwangsläufig die vorübergehende oder auch eine anhaltende Ansäuerung des extrazellulären Mikromilieus. Daneben ist der Sauerstoffverbrauch ein weiterer metabolischer Marker, der u.a. die Aktivität der Mitochondrien widerspiegelt. Mit diesen beiden Parametern, ΔpH und ΔpO_2 , können also wichtige Informationen über die Reaktivität der Zellen

sowie Rück-schlüsse auf die Wirkung von Hormonen und Wachstumsfaktoren, Pharmaka und Zytostatika, sowie anderen Modulatoren zellulärer Funktionen erhalten werden. Für diese metabolischen Parameter gibt es Mikrosensoren, mit denen an kultivierten Zellen Veränderungen in der Ansäuerungs- und O_2 -Verbrauchsrate gemessen werden können. Die Erfassung der Dynamik des Energiestoffwechsels kann damit grundlegende und funktionelle Informationen über die Vitalität der Zellen liefern, ohne dass ein detailliertes Wissen über die Signalwege erforderlich wäre (Wolf et al., 1998c).

Systemanalytisch betrachtet stellen multizelluläre Verbände, wie sie in Geweben und im Organismus vorliegen, komplexe dynamische Mikrosysteme dar, deren Funktionalität konsequenterweise mit dynamisch arbeitenden Testsystemen charakterisiert werden sollte. Diese Betrachtung führte zu Entwicklungen multiparametrischer bioelektronischer Testsysteme, die parallel sowohl metabolische als auch membranassoziierte Parameter an lebenden Zellen erfassen (Ehret et al., 2001; Wolf et al., 1998b). Eine wichtige Voraussetzung dabei ist der Einsatz eines Zellkultursystems, das einerseits die Kulturbedingungen für die spezifischen Bedürfnisse der Zelle (Medium, Wachstumsmatrix, pH, pO_2) gewährleistet und andererseits die Ausgangssignale der Zellen kontinuierlich und quasi in Echtzeit erfassen lässt. Ein Perfusionssystem, das für eine steuerbare Zu- und Abfuhr des Kulturmediums sorgt, ist dabei ein wichtiger Bestandteil zur Anpassung an mikrophysiologische Bedingungen. Es erlaubt zudem die Zugabe und das Entfernen von Testsubstanzen mit dem Kulturmedium, ohne die Kultur zu stören oder die Messung zu unterbrechen. Mit diesem Testverfahren ist eine funktionelle Analyse der biologischen Wirkung von Wirkstoffen an lebenden Zellen und Zellverbänden über längere Zeiträume möglich. Die folgenden Untersuchungen an Tumorzellkulturen sollen demonstrieren, wie mit Hilfe von multiparametrischen Sensorchips der Verlauf metabolischer und morphologischer Prozesse bei Einwirkung von verschiedenen Testsubstanzen analysiert werden kann.

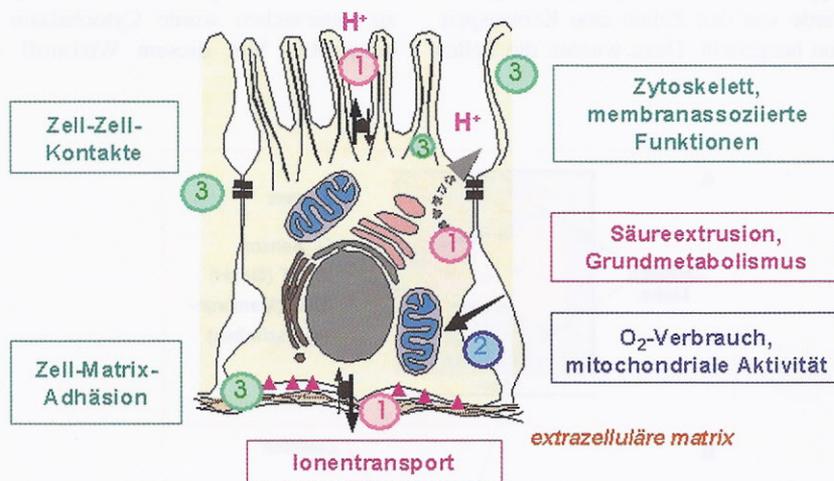


Abb. 1: Darstellung grundlegender metabolischer und extrazellulärer Signale, die von elektrischen Sensoren in unmittelbarer Umgebung der Zellen erfasst werden können.

(1) Die Extrusion von Ionen, insbesondere von Säuren, bedingen die Ansäuerung des Mediums, die mit ISFETs gemessen wird. (2) Die Zellatmung, die vorwiegend in den Mitochondrien stattfindet, führt zum Entzug von Sauerstoff aus dem Medium. (3) Verschiedene membranassoziierte Faktoren, wie die Ausstattung mit unterschiedlichen Zell-Zellkontakt-Strukturen, die Adhäsion an extrazelluläre Matrix sowie die Morphologie der Zellen, die durch die Organisation des Zytoskeletts bestimmt wird, tragen dazu bei, dass sich Zellverbände wie elektrische Isolatoren verhalten. Diese werden durch den Wechselstromwiderstand (Impedanz) charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

Die humane Kolonkarzinom Zelllinie LS174T wird seit vielen Jahren in unserem Labor verwendet; sie wird routinemäßig in Dulbecco's MEM mit 10% FCS (Seromed, Biochrom, D-Berlin) kultiviert. Histologische DNA-Färbung mit Bisbenzimid zeigt die Zellen frei von Mykoplasmen. Medium, Biochemikalien sowie die Testsubstanzen Cytochalasin B und Chloracetaldehyd wurden von Sigma (D-Taufkirchen) bezogen. Stamm-lösungen wurden von Cytochalasin B in Dimethylsulfoxid (DMSO) und von Chloracetaldehyd in H₂O hergestellt.

2.2 Sensorchip-Testverfahren

Das zentrale Bauelement des Messstandes besteht aus sechs Modulen mit je einer Zellkulturkammer und einem integrierten Siliziumchip, der mit planaren Sensoren belegt ist (Herstellung: Micronas, D-Freiburg). Bei den Sensoren handelt es sich um fünf pH-empfindliche ionensensitive Feldeffekttransistoren (pH-ISFETs), einer amperometrischen Struktur für O₂-Messung und interdigitale Elektrodenstrukturen (IDES) für die Impedanzmessung (Abb. 2A).

Für Versuche mit elektronischen Siliziumchips wurden die Zellen direkt auf die Chips gegeben und etwa zwei Tage im CO₂-begasteten Inkubator bei 37°C kultiviert. Danach wurden diese Chips in das Messgerät eingesetzt und mit einem Fluidiksystem verbunden, welches die Zellen mit Nährmedien und Wirkstofflösungen versorgt. Die Zufuhr des Kulturmediums ist computergesteuert; die Pumprate betrug hier 150 µl/min. Um Veränderungen im Medium detektieren zu können, wurde die Zufuhr in einem regelmäßigen Rhythmus für 3 min angeschaltet (Fliess-Phase) und 7 min abgeschaltet (Stop-Phase). Da die hohe Pufferkapazität des Mediums pH-Veränderungen unterdrückt, wurde Medium ohne Bikarbonat- und HEPES-Puffer verwendet. Vor dem Ende der Versuchszeit werden die Zellen mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert bzw. abgetötet, um ein Basissignal für die Messbedingungen zu erhalten. Ein Auswertungsprogramm berechnet die Steigung der pH- und pO₂-Veränderungen während der Stop-Phase. Weitere Details des Testver-

fahrens sind beschrieben in Brischwein et al. (2003).

2.3 ATP-Bestimmung

Zellen wurden in Mikrotiterplatten unter standardmäßigen Kulturbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Diese Kulturen erhielten in parallelen Ansätzen Testsubstanzen und wurden bei 37°C für die angegebenen Zeiten weiter inkubiert. Nach der Zelllyse wurde der ATP-Gehalt mit einem ATP-Biolumineszenz-Testverfahren nach der Vorschrift des Herstellers (Packard, PerkinEmer Life Sciences, D-Rodgau-Jügesheim) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der ATP-verbrauchenden Reaktion von Luziferin mit O₂ zu Oxyluziferin unter Abgabe von Licht bei 560 nm.

2.4 Bestimmung der Zellzahl

Vor der Zugabe von Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen wurden die Zellen in 24-Well Platten bis zur Semikonfluenz kultiviert. Die weitere Inkubationszeit betrug dann 24 Stunden. Um Probleme der Zellverklumpung und unkontrollierten Zellschädigung bei der Suspensierung mit der standardmäßigen Trypsin/EDTA-Lösung zu umgehen, wurde von den Zellen eine Kernsuspension hergestellt. Dazu wurden die Zellen

mit hypotonem Puffer bei Raumtemperatur etwa 15 min behandelt und dann mit einer Benzalkoniumchlorid-Lösung lysiert (Otto et al., 1991). Die suspendierten Kerne wurden mit einem elektronischen Zellzählgerät (Casy, Schärfe System) ausgezählt und nach ihrer Größenverteilung analysiert.

3 Ergebnisse

Die etablierte Zelllinie eines humanen Kolonkarzinoms, LS174T, diente bisher als ein Modellsystem für multiparametrische Analysen der Zellvitalität. Trotz ihrer malignen Eigenschaften zeigen die Zellen bei Konfluenz Epithel ähnliche Morphologie und wachsen auf den Sensorchips zu einem Monolayer. Das Anwachsen und die Vermehrung der Zellen kann mit Hilfe der Impedanzmessung verfolgt werden, wie es sich anhand der Kapazitäts- und Widerstandsmessungen zeigt. Die mit elektrischen Sensoren gemessenen metabolischen Parameter, d.h. extrazelluläre Ansäuerung und O₂-Verbrauch, weisen dann eine steigende Aktivität auf (Wolf et al., 1998a).

Um die Wirkung eines toxischen Agens zu untersuchen wurde Cytochalasin B eingesetzt. Von diesem Wirkstoff ist

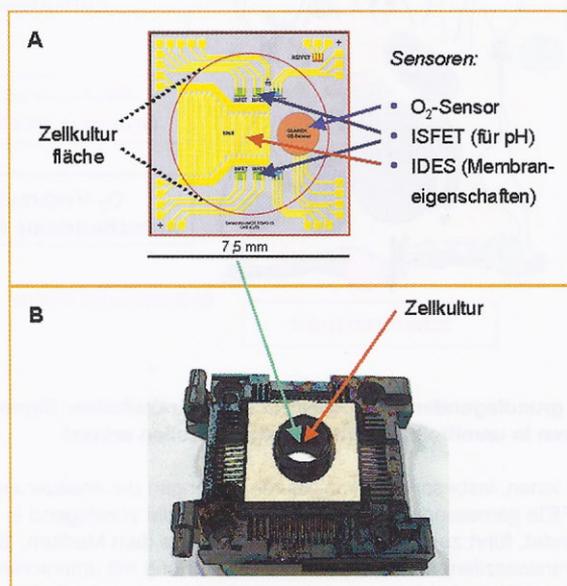


Abb. 2: Darstellung (A) eines Siliziumchips und (B) einer Einfassung des Chips für die Zell- und Gewebekultur.

bekannt, dass er zur Depolymerisierung von Aktinfilamenten führt und die Glukoseaufnahme von Zellen hemmt (Mizel and Wilson, 1972). Die Zugabe von Cytochalasin B zu Kulturen von LS174T-Zellen bewirkte sehr rasche Veränderungen in den Messparametern (Abb. 3): Die Ansäuerungsrate fiel ab, was sich mit der gedrosselten Glykolyse-Aktivität aufgrund der reduzierten Glukoseaufnahme erklären lässt. Gleichzeitig stieg der Sauerstoffverbrauch stark an. Es wäre zu vermuten, dass dies mit einer erhöhten mitochondrialen Aktivität zur kompensatorischen Produktion von ATP zu erklären ist.

Um diese elektro-sensorischen Messungen mit einem biochemischen Testverfahren zu vergleichen, wurde der ATP-Gehalt der Zellen zu den verschiedenen Einwirkzeiten bestimmt (Abb. 4A). Zu erwarten wäre, dass der erhöhte O₂-Verbrauch einen erhöhten mitochondrialen Stoffwechsel widerspiegelt, der für Erhaltung des ATP-Gehaltes sorgt. Tatsächlich wurde aber beobachtet, dass der ATP-Spiegel zunächst um bis zu 30% absank,

um nach etwa 3 Stunden wieder anzusteigen, ohne innerhalb der nächsten 20 Stunden das Ausgangsniveau zu erreichen. Diese Divergenz könnte in der Entkopplung des mitochondrialen Elektronenflusses von der ATP-Synthese begründet liegen. Die Zellzählung nach 24 Stunden zeigte, dass die Zellzahl der mit Cytochalasin B behandelten Kulturen, wie zu erwarten, nicht zugenommen hatte (Abb. 4B); dabei nahm der Anteil an vergrößerten Zellkernen aufgrund der Mitosehemmung zu. Ein Zellsterben wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht beobachtet. Wie diese verschiedenen Testverfahren belegen, blieben diese Zellen metabolisch aktiv.

Wenn Cytochalasin B nach einer zweistündigen Wirkzeit aus der Kultur entfernt wurde, kehrten die Messparameter rasch zu den Ausgangswerten zurück (Abb. 5A): Die Ansäuerungsrate stieg wieder an, der O₂-Verbrauch fiel zunächst unter das Ausgangsniveau. Dieser Versuch zeigt außerdem, wie sich gleichzeitig die Impedanzwerte der Zellen veränderten (Abb. 5B). Der durch Cytochalasin

B bedingte Anstieg des kapazitiven Widerstandes ging nach dem Entfernen des Agens ebenfalls wieder zurück. Diese Veränderungen lassen sich mit dem Ab- und Aufbau der Aktinfilamente und der damit vorübergehenden Abrundung der Zellen erklären. Aus diesem Versuch ist zu erkennen, dass die Ansäuerungsrate und der O₂-Verbrauch sowie Veränderungen in der Morphologie der Zellen empfindliche Indikatoren für die unmittelbare Wirkung von Cytochalasin B sind. Außerdem ist dieser Versuch ein Beispiel dafür, dass die Zugabe und die Entfernung des Wirkstoffes ohne Störungen an der Zellkultur und in der Messung vollzogen werden kann.

Von Testsubstanzen mit anderen Wirkmechanismen ist auch ein anderes metabolisches Muster der Zellen zu erwarten. Als weiterer Wirkstoff wurde Chloracetaldehyd, ein aktiver Metabolit der onkologischen Chemotherapeutika Ifosfamid und Cyclophosphamid, gewählt. Seine Wirkung wird in der Regel mit der Alkylierung der DNS erklärt (Singer, 1996). Bei Zugabe zur Zellkultur bewir-

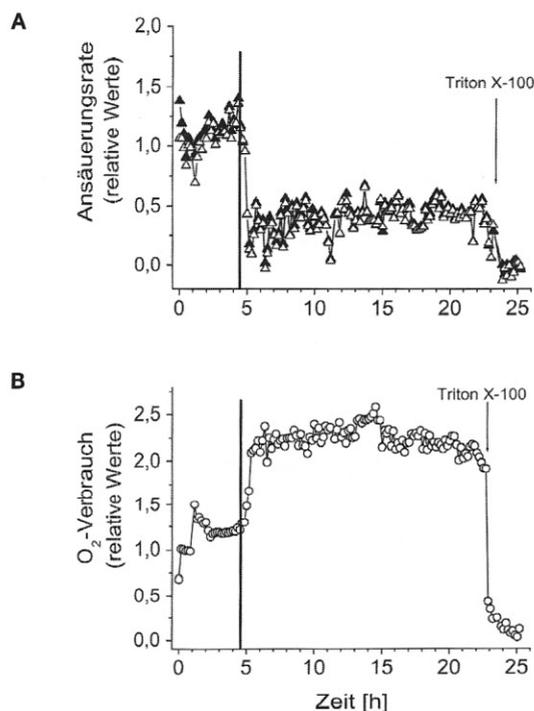


Abb. 3: Verlauf der mikrosensorischen Messungen an LS174T Zellen vor und nach Zugabe von 1 µM Cytochalasin B (Linie). (A) extrazelluläre Ansäuerungsrate (Messung zweier paralleler ISFETs: ▲, △) und (B) O₂-Verbrauch.

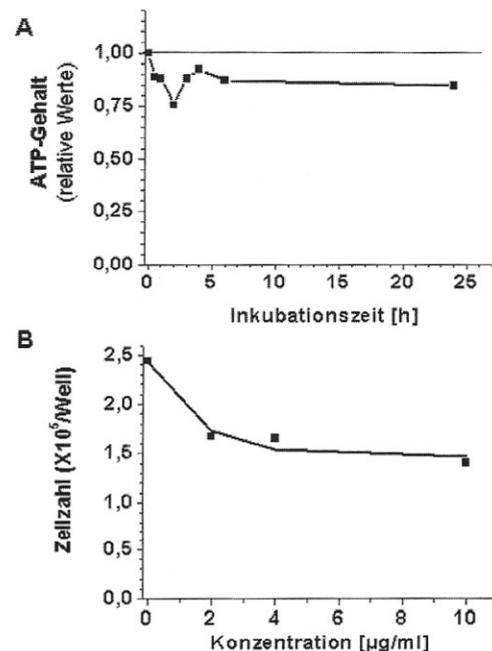


Abb. 4: Veränderungen im ATP-Gehalt (A) und der Zellzahl (B) von LS174T-Zellen nach Zugabe von Cytochalasin B. (A) Bestimmung des ATP-Gehaltes in Kulturansätzen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit [1 µM] Cytochalasin B. Angegeben ist die relative Veränderung im ATP-Gehalt gegenüber unbehandelten Zellen. (B) Bestimmung der Zellzahl nach Inkubation für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Cytochalasin B.



kte diese Substanz rasche Veränderungen zunächst im O₂-Verbrauch, der rasch abfiel (Abb. 6). Dies dürfte ein Hinweis auf die Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen sein.

Mit etwas Verzögerung fiel auch die Ansäuerungsaktivität ab, während der kapazitive Widerstand bis zu einem Plateau ansteigt. Die Bestimmung des ATP-Gehaltes ergab einen vorübergehenden Anstieg um bis zu 45% nach 2-3 Stunden (Abb. 7A). Dieses Ergebnis war aufgrund des raschen Abfalls des O₂-Verbrauchs überraschend. Danach jedoch fiel auch der ATP-Spiegel kontinuierlich ab. Zellzählungen ergaben, dass nach 24 Stunden fast keine lebenden Zellen in der Kultur verblieben (Abb. 7B), was die zytotoxische Wirkung des Chloracetaldehyds bestätigt. Wurde Chloracetaldehyd jedoch nach einer fünfstündigen Wirkzeit aus der Kultur entfernt, zeigte sich zweierlei: die Ansäuerungsrate blieb auf dem niedrigeren Niveau, während der O₂-Verbrauch wieder anstieg (Henning et al., 2001). Wie zu erwarten, bewirkt also Chloracetaldehyd ein anderes Muster an metabolischen Veränderungen als Cy-

tochalasin B. Somit zeigen diese multiparametrischen Messungen, dass die unterschiedliche Wirkweise von Testsubstanzen auf Zellen metabolisch charakterisiert werden kann. Das ist gerade bei ungenügenden Kenntnissen des Wirkmechanismus ein wichtiger Aspekt.

4 Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, erlaubt der Einsatz der multiparametrischen Sensorchips die gleichzeitige Erfassung metabolischer und membranassoziierter Parameter in derselben Zellprobe. Das Signalmuster gibt die Veränderungen über einen kontinuierlichen Zeitraum – hier etwa 24 Stunden – wieder. In weiteren Versuchen wurden die Signale bereits bis zu fünf Tagen verfolgt. Der Verlauf der Veränderungen in der extrazellulären Ansäuerung, des O₂-Verbrauchs und der Impedanz geben differenzierte Informa-

tionen über die Eigenschaften der Zellen und die Wirkung der Testsubstanz.

Die Versorgung der Zellen mit Kulturmedium mittels eines programmierbaren Perfusionssystems ermöglicht eine Annäherung an verschiedene mikro-physiologische Bedingungen. Über das Kulturmedium können verschiedene extrazelluläre Parameter wie pH, Nährstoffzusammensetzung und -konzentration und mit einer Hypoxiekammer der pO₂ eingestellt werden, um verschiedene zelluläre Bedürfnisse zu erfüllen oder pathologische Zustände zu simulieren. Die Herstellung von bzw. Annäherung an eine für den Zelltyp charakteristische Mikroumgebung ist eine elementare Voraussetzung dafür, dass Testsubstanzen eine *in vivo* ähnliche Wirkung entfalten können.

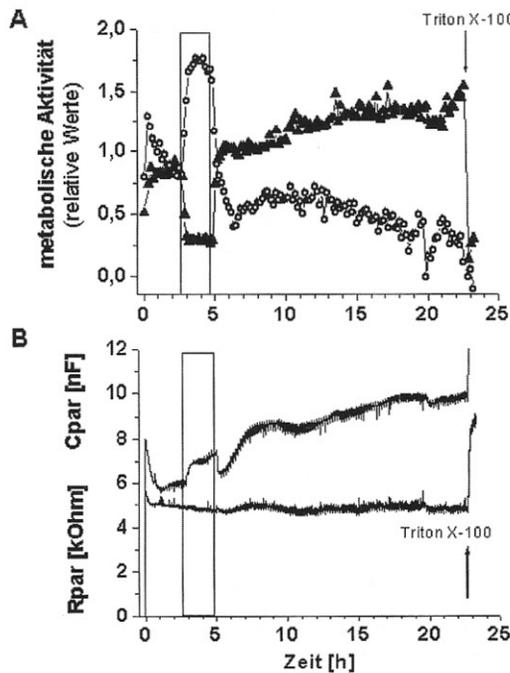


Abb. 5: Verlauf der mikrosensorischen Messungen an LS1747 Zellen bei vorübergehender Zugabe von 1 µM Cytochalasin B (Balken). (A) extrazelluläre Ansäuerung (▲) und O₂-Verbrauch (○); (B) Impedanz.

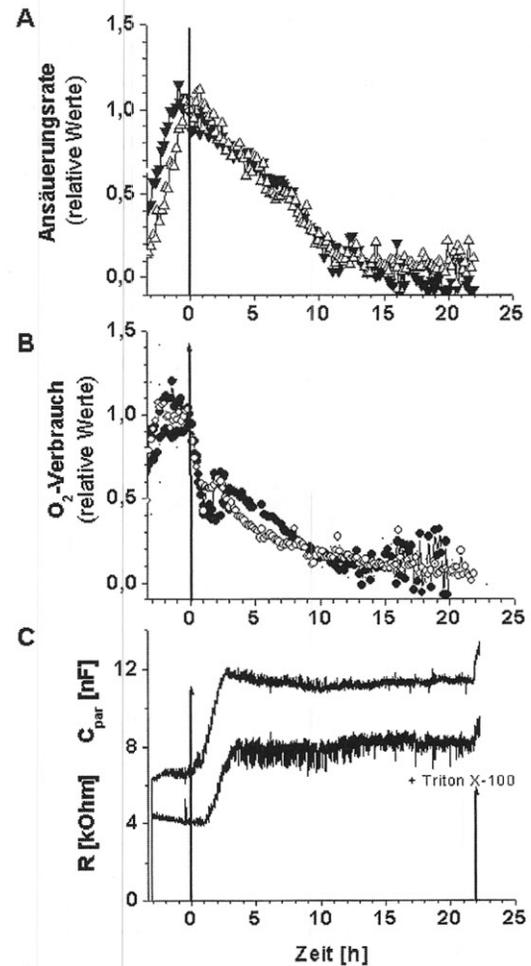


Abb. 6: Verlauf der mikrosensorischen Messungen an LS1747 Zellen bei Zugabe von Chloracetaldehyd [50 µM] (bei 0 Stunden). (A) extrazelluläre Ansäuerung; (B) O₂-Verbrauch; (C) Impedanz. In (A) und (B) sind Messkurven von zwei Ansätzen dargestellt.

Es wird oft argumentiert, dass die Messung solcher globaler Parameter keine Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zulässt. In der Tat muss die Frage nach den spezifischen biochemischen Wirkmechanismen naturgemäß mit ergänzenden Methoden abgeklärt werden. Am Beispiel von Cytochalasin B und Chloracetaldehyd, zwei Substanzen, für die Wirkmechanismen beschrieben sind, zeigt sich jedoch, dass neue Aspekte zu deren Wirkung gewonnen werden konnten (Otto et al., 2003). Bei Cytochalasin B lässt sich die reduzierte Ansäuerungsrate mit der gedrosselten Glykolyse und die Impedanzänderung mit dem Abrunden der Zellen begründen, doch der starke Anstieg im O₂-Verbrauch war unerwartet und bedarf noch der Abklärung. Der gleichzeitige Abfall im ATP-Spiegel könnte auf eine Entkopplung der Elektronenkette von der ATP-Synthese in den Mitochondrien hinweisen. Bei Chloracetaldehyd dagegen lässt sich der rasche Abfall im O₂-Ver-

brauch nicht aufgrund der bekannten DNA-alkylierenden Wirkung vorhersehen. Vielmehr deuteten bereits frühere Untersuchungen mit Elektronenverlustspektroskopie (EELS) darauf hin, dass Chloracetaldehyd sich nicht nur im Kern, sondern auch in den Mitochondrien anreichert (Wolf et al., 1996). Dazu passt, dass der oxidative Fettabbau, der in Mitochondrien stattfindet, durch Chloracetaldehyd gehemmt wird (Visarius et al., 1999). Andererseits stieg der ATP-Spiegel vorübergehend an (Abb. 7), was sich zunächst und am einfachsten mit der Hemmung im ATP-Verbrauch erklären lässt. In anderen Zellsystemen tritt dieser Effekt im Zusammenhang mit der Induktion der Apoptose auf (Sanchez-Alcazar et al., 1997). Auch wenn die hier zugrunde liegenden Prozesse im Metabolismus weiterer Untersuchungen bedürfen, so gibt die Erfassung

globaler zellulärer Vitalitätsparameter bereits zu erkennen, ob Zellen auf Wirkstoffe reagieren. Das führt zu einem wichtigen Aspekt des Testverfahrens: Es kann zum funktionellen Nachweis noch unbekannter Stoffe und Stoffgemische eingesetzt werden.

Neben dieser wirkmechanistischen Analyse ist das Testsystem für den parallelen Einsatz und somit direkten Vergleich verschiedener Zell- und Gewebekulturen geeignet. Die kontinuierliche Perfusion der Zellen mit Kulturmedium bildet die realen mikrophysiologischen Bedingungen besser ab als die „klassische“ Zellkultur und ermöglicht Langzeitkulturen, besonders für langsam proliferierende Zellen. Damit kann die Messung auch Wirkungen mit veränderlichen zeitlichen

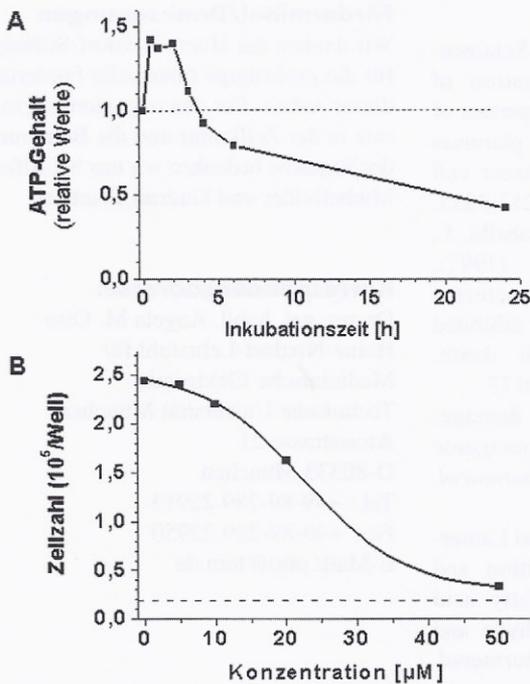


Abb. 7: Veränderungen im ATP-Gehalt (A) und der Zellzahl (B) von LS174T-Zellen nach Zugabe von Chloracetaldehyd. (A) Bestimmung des ATP-Gehaltes in Kulturansätzen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit [50 µM] Chloracetaldehyd. Angegeben ist die relative Veränderung im ATP-Gehalt gegenüber unbehandelten Zellen. (B) Bestimmung der Zellzahl nach Inkubation für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Chloracetaldehyd.

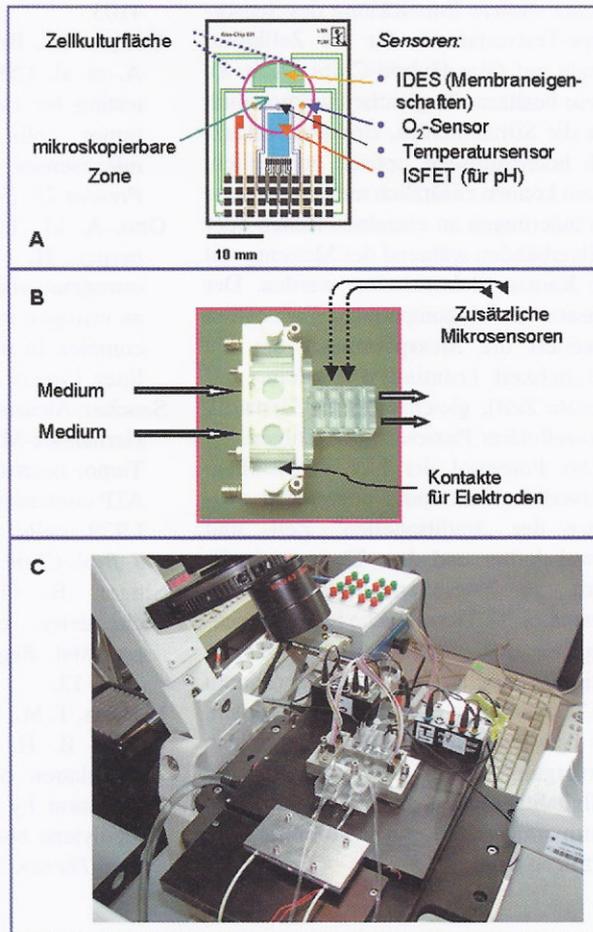


Abb. 8: Darstellung (A) eines Glashybrid-Chips und (B) sein Einsatz in einer Doppel-Kulturkammer zur Anwendung in Verbindung mit optischen Analytikverfahren. Die Abbildung (C) zeigt das Foto einer praktischen Ausführung des Chip-Systems auf dem Tisch eines Inversmikroskops.



Abläufen verfolgen, die sonst bei Endpunktmessungen nur durch aufwändige parallele Versuchsansätze erfasst werden können. Dies ist von besonderer Bedeutung in einem Versuchsprotokoll, bei dem die Wirkung einer Testsubstanz auf Kulturen unterschiedlicher Zelltypen und Wachstumsraten getestet werden soll. Ein solches Protokoll wäre geeignet, um analog zum intakten Organismus die Sensitivität auch solcher Zellen zu testen, die eine zentrale metabolische Rolle spielen (z.B. Leberzellen) und die nicht zu den eigentlichen Targetzellen gehören. Des Weiteren besteht mit dem Perfusions-system die Möglichkeit, die Testsubstanz analog zur *in vivo* Situation graduell zu entfernen, um die Nachhaltigkeit der Wirkung zu verfolgen. Ein Beispiel dafür ist der Versuch in Abbildung 5.

Eine weitere Entwicklung des Sensor-chips-Testverfahrens für die Zellkultur beruht auf Glas-Hybrid-Chips (Abb. 8). Diese besitzen die gleiche Funktionalität wie die Siliziumchips, sind aber zusätzlich hochauflösend optisch zugänglich. Somit können zusätzlich morphologische Veränderungen an einzelnen Zellen oder Zellverbänden während der Messung mit der Kamera dokumentiert werden. Der Einsatz von biokompatiblen Farbstoffen erweitert die Messparameter um die Möglichkeit (zumindest für eine begrenzte Zeit), gleichzeitig die Dynamik intrazellulärer Prozesse zu verfolgen.

Das Potenzial der hier vorgestellten Testverfahren ist somit angesiedelt zwischen der „traditionellen“ Zell- und Gewebekultur und dem Tierversuch. Es wäre zu begrüßen, wenn monoparametrische Tierversuche in der Screeningphase und zur Abklärung allgemein toxischer oder anderer Wirkungen durch ein Testverfahren ersetzt werden könnten, das den Testzellen eine *in vivo* ähnliche Versorgung bietet und zugleich die Zellvitalität auch über längere Zeiträume multiparametrisch und kontinuierlich verfolgen kann.

Literatur

- Brischwein, B., Motrescu, E., Cabala, E. et al. (2003). Functional Cellular Assays with Multiparametric Silicon Sensor Chips. *Lab. on a Chip* 3, 234-240.
- Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, B. et al. (2001). Multiparametric micro-sensor chips for screening applications. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369, 30-35.
- Henning, T., Brischwein, M., Baumann, W. et al. (2001). Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay. *Anti-Cancer Drugs* 12, 21-32.
- Mizel, S. B. and Wilson, L. (1972). Inhibition of the transport of several hexoses in mammalian cells by Cytochalasin B. *J. Biol. Chem.* 247, 4102-4105.
- Otto, A. M., Brischwein, M., Niendorf, A. et al. (2003). Microphysiological testing for chemosensitivity of living tumor cells with multiparametric microsensor chips. *Cancer Detect Prevent* 27, 291-296.
- Otto, A. M., Faderl, M. and Schönerberger, H. (1991). Dissociation of estrogenic and cytotoxic properties of an estrogen receptor-binding platinum complex in human breast cancer cell lines. *Cancer Research* 51, 3217-3223.
- Sanchez-Alcazar, J. A., Ruiz-Cabello, J., Hernandez-Munoz, I. et al. (1997). Tumor necrosis factor-alpha increases ATP content in metabolically inhibited L929 cells preceding cell death. *J. Biol. Chem.* 272, 30167-30177.
- Singer, B. (1996). DNA damage: chemistry, repair, and mutagenic potential. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 23, 2-13.
- Visarius, T. M., Stucki, J. W. and Lauterburg, B. H. (1999). Inhibition and stimulation of long-chain fatty acid oxidation by chloroacetaldehyde and methylene blue in rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 289, 820-824.

Wolf, B., Brischwein, M., Baumann, W. et al. (1998a). Microsensor-aided measurements of cellular signalling and metabolism on tumor cells. The cell monitoring system (cms(R)). *Tumour Biology* 19, 374-383.

Wolf, B., Brischwein, M., Baumann, W. et al. (1998b). Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: the Physio Control-Microsystem (PCM). *Bio-sensors & Bioelectronics* 13, 501-509.

Wolf, B., Dinger, V., Weiler, C. et al. (1996). Drug targeting and metabolic investigations of cryoprepared tumor cells with analytical electron energy loss spectroscopy. *Tumour Biology* 17, 234-250.

Wolf, B., Kraus, M., Brischwein, M. et al. (1998c). Biofunctional hybrid structures - Cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 46, 215-225.

Fördermittel/Danksagungen

Wir danken der Heinz-Nixdorf-Stiftung für die großzügige finanzielle Förderung dieser Arbeit. Für den engagierten Einsatz in der Zellkultur und die Betreuung der Versuche bedanken wir uns bei Alfred Michelfelder und Gudrun Teschner.

Korrespondenzadresse:

Dr. rer. nat. habil. Angela M. Otto
Heinz-Nixdorf-Lehrstuhl für
Medizinische Elektronik
Technische Universität München
Arcisstrasse 21
D-80333 München
Tel.: +49-89-289 22913
Fax: +49-89-289 22950
E-Mail: otto@tum.de