

Imaging-Technologie

2D-Visualisierung des zellulären Sauerstoffverbrauchs in Mikrofluidiksystemen

CHRISTOPHER J. OCHS¹, JUNICHI KASUYA², ANDREA PAVESI¹, GREGOR LIEBSCH³

¹ SINGAPORE MIT ALLIANCE FOR RESEARCH AND TECHNOLOGY, BIOSYSTEMS AND MICROMECHANICS, SINGAPUR

² MECHANOBIOLOGY LABORATORY, DEPARTMENT OF BIOLOGICAL ENGINEERING, MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY, MA, USA

³ PRESENS PRECISION SENSING GMBH, REGENSBURG

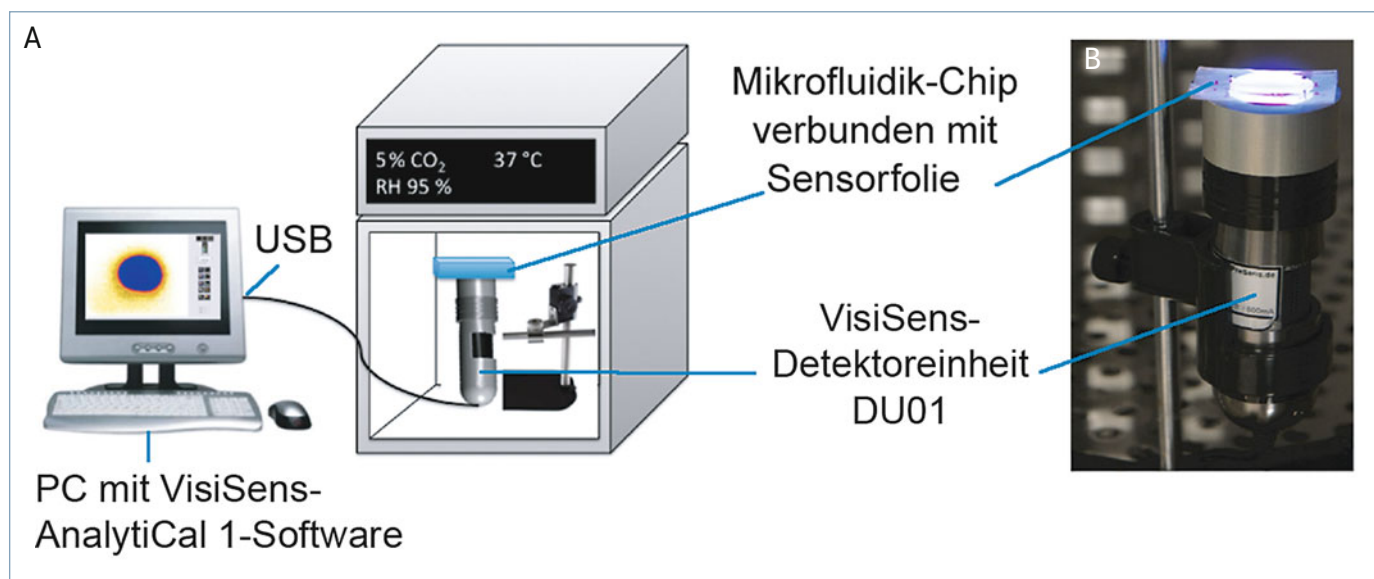
A new imaging system allows visualizing oxygen distributions in 2D. Combining sensor foils with microfluidic devices enables online monitoring of cellular oxygen consumption in whole chip areas. Furthermore, suitable device materials depending on application and cell line can be determined. Numerically simulated oxygen consumption of rat lung microvascular endothelial cells and rat hepatocytes was experimentally validated.

DOI: 10.1007/s12268-014-0518-y
© Springer-Verlag 2014

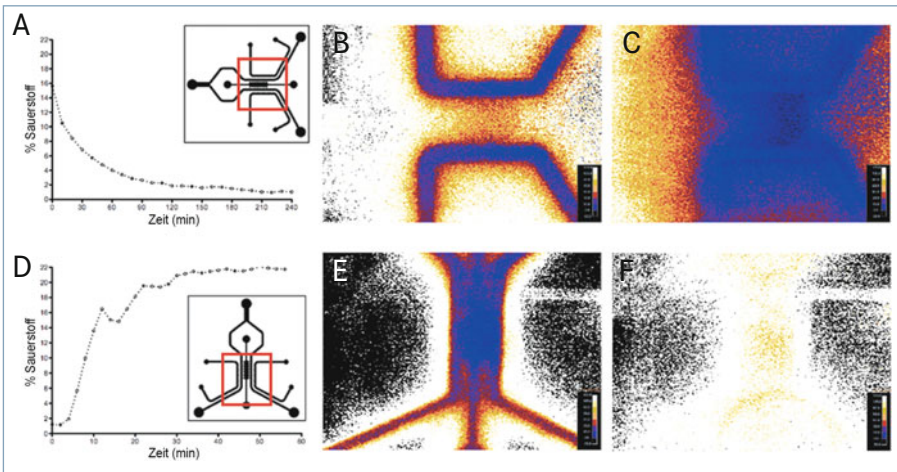
■ In den letzten Jahren haben sich Mikrofluidiksysteme als vielseitige Plattformen zur Untersuchung von Zellverhalten oder

Signaltransduktion etabliert, da sich bestimmte Mikroumgebungen, wie z. B. Mikrotumoren, darin nachbilden lassen [1].

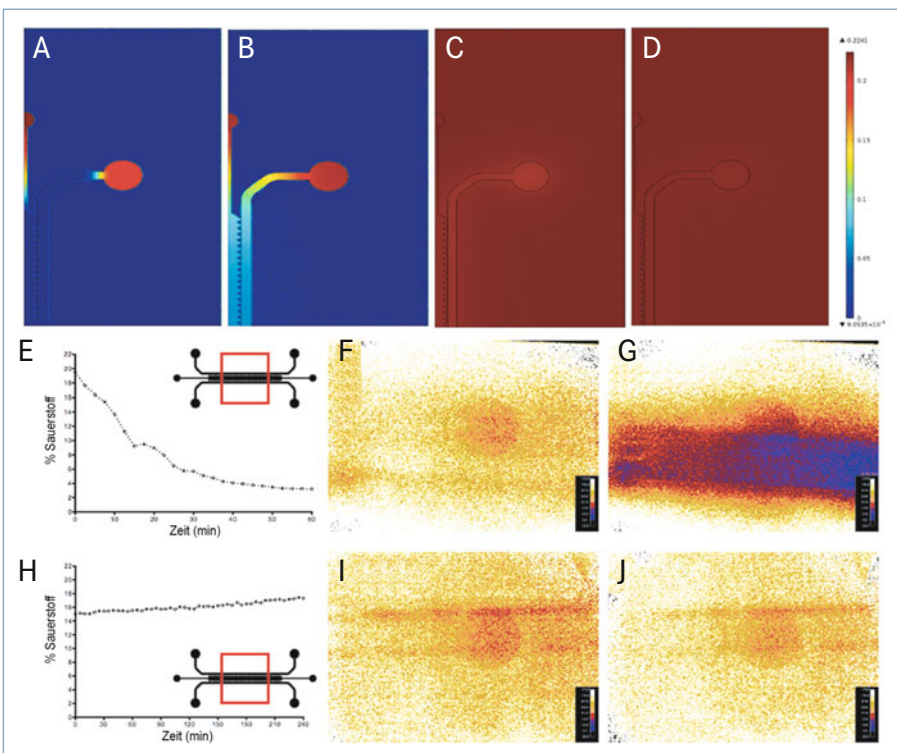
Für Studien im Labormaßstab werden oft Chips aus Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet, da sie einfach herzustellen, transparent, biokompatibel und gasdurchlässig sind. Materialien wie Cycloolefin-Ko-Polymer (COC), Polystyrol (PS) oder Polypropylen (PP) eignen sich wegen ihrer Sauerstoffundurchlässigkeit besonders für hypoxische oder anoxische Kulturbedingungen. Das Interesse an dieser neuen Technologie steigt, doch es ist noch sehr wenig über den zellulären Sauerstoffverbrauch und mögliche Auswirkungen des Sauerstoffgehalts auf das Zellverhalten und die Viabilität während der Kultivierung in Mikrofluidiksystemen bekannt. Bereits angewandte Verfahren, wie z. B. die Messung mit Sensoren an Ein- und Ausgängen der Medienkanäle eines Chips [2], können nicht den gesamten Zellkulturbereich des Chips kontinuierlich überwachen. Neue Möglichkeiten eröffnen sich durch den Einsatz von Sensorsystemen, die auf ratiometrisches Imaging der Fluores-



▲ **Abb. 1:** Experimentaufbau. **A,** Die VisiSens-Detektoreinheit DU01 wird im Inneren eines regelbaren Inkubators installiert und ist über USB mit einem PC verbunden; mit der darauf installierten VisiSens-AnalytiCal 1-Software können die Detektoreinheit gesteuert und Aufnahmen aufgezeichnet werden. Der mit Sensorfolie verbundene Chip wird über der Kamera angebracht. **B,** Die Sauerstoffsensorfolie am Mikrofluidik-Chip zeigt in Richtung Detektoreinheit; der Fluoreszenzfarbstoff in der Sensorfolie wird mit Licht, das von der Detektoreinheit ausgeht, angeregt und gibt abhängig von der Sauerstoffkonzentration ein Fluoreszenzsignal zurück, das über die Detektoreinheit aufgezeichnet wird.



▲ **Abb. 2:** Änderung der Sauerstoffspannung im Hypoxia-Chip. A–C, Perfusion mit Stickstoff, hypoxische Bedingungen; D–F, Perfusion mit Luft, Reoxygenierung. A, D, Sauerstoffspannung, aufgezeichnet in der gesamten Gelregion; B, C, E, F, erstes und letztes Bild der entsprechenden Zeitserienaufnahmen.



▲ **Abb. 3:** Projektion des Sauerstoffverbrauchs von hoch aktiven Hepatozyten (HEP) und Lungenendothelzellen (EC) in Mikrofluidiksystemen nach bestimmten Zeitspannen. A, HEP in COC nach 1,5 Stunden; B, EC in COC nach zwei Stunden; C, HEP in PDMS nach vier Stunden; D, EC in PDMS nach zwei Stunden. E–G, Entwicklung der Sauerstoffspannung im Chip während der HEP-Kultur in COC über eine Stunde; H–J, und in PDMS über vier Stunden. F, G, I, J, erstes und letztes Bild der entsprechenden Zeitserienaufnahmen. COC: Cycloolefin-Ko-Polymer-Chip; PDMS: Polydimethylsiloxan-Chip.

zenzabschwächung eines sauerstoffsensitiven Farbstoffs basieren – wie das VisiSens-A1-Imaging-System von PreSens. Der sauerstoffsensitive Fluoreszenzfarbstoff ist in einer Polymermatrix eingebettet und auf eine Folie aufgebracht. Diese wird direkt auf

die zu untersuchende Probe aufgelegt und kontaktfrei mit einem kompakten, USB-betriebenen Fluoreszenzmikroskop ausgelesen. So können O_2 -Verteilungen ganzer Bereiche eines Mikrofluidik-Chips zweidimensional erfasst werden.

Mikrofluidik-Chips kombiniert mit Imaging-Technologie

Die VisiSens-Sauerstoffsensorfolie wird an der Unterseite des Chips angebracht und versiegelt dabei die in das Kunststoffplättchen eingepprägten Mikrokanäle. So entsteht ein stabiles System für Zellkulturanwendungen. Hierfür werden Sensorfolien durch Rotationsbeschichtung mit einer dünnen Schicht aus PDMS (zehn Mikrometer) versehen. PDMS verbindet sich gut mit PDMS, aber auch mit COC, und die so beschichteten Sensorfolien können durch Plasmabehandlung irreversibel mit COC- oder PDMS-Plättchen verklebt werden. Der Vergleich mit unbehandelten Sensorfolien zeigt, dass PDMS-Beschichtung, Trockenzeit und Plasmabehandlung die Sensorleistung der Folien nicht beeinflussen [3]. Die so erzeugten Mikrofluidik-Chips können also zur O_2 -Überwachung verschiedener Zelllinien eingesetzt werden.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurde ein kürzlich eingeführter Hypoxia-Chip aus PDMS, der bereits mit anderen O_2 -Messverfahren charakterisiert wurde [4], mit einer Sensorfolie versehen. In diesem Chip können über eine zentrale Zellkulturregion einheitlich hypoxische Bedingungen, aber auch Sauerstoffgradienten erzeugt werden. Zur Untersuchung des O_2 -Verbrauchs verschiedener Zelllinien wurden PDMS- und COC-Chips mit einfacher Geometrie, aber vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten mit einer beschichteten Sensorfolie verbunden (Abb. 1). Diese Chips umfassen eine lange Gelregion, um Zellen in 3D-Matrices zu untersuchen, und angrenzende Medienkanäle (für 2D-Kultur) [5]. Wir verwendeten die Finite-Element-Software (COMSOL Multiphysics v4), um den O_2 -Verbrauch verschiedener Zelllinien in den Mikrofluidiksystemen aus PDMS und COC numerisch zu simulieren. Das Ergebnis sollte experimentell mit VisiSens validiert werden.

Sauerstoffmessung in Mikrofluidiksystemen für Hypoxie-Studien

Die Untersuchung des charakterisierten Hypoxia-Chips ermöglichte es uns, VisiSens mit alternativen O_2 -Messverfahren zu vergleichen. Die Gaskanäle des mit Wasser und Kollagen gefüllten Chips wurden mit Stickstoff durchströmt, um einheitlich hypoxische Bedingungen entstehen zu lassen. Die Veränderung der O_2 -Konzentration in der Gelregion des Chips wurde dabei mit VisiSens über mehrere Stunden aufgezeichnet. Die Sauerstoffspannung nahm innerhalb von 1,5 Stunden

den auf drei Prozent und in vier Stunden auf bis zu ein Prozent ab (**Abb. 2A–C**). Im Vergleich mit alternativen Methoden zur Sauerstoffmessung passen die mit VisiSens erzielten Resultate besser zu den ermittelten Simulationsdaten (drei Prozent nach einer Stunde). Auch der gegenläufige Effekt der Reoxygenierung ließ sich mit VisiSens genau verfolgen (**Abb. 2D–F**).

Zellulärer Sauerstoffverbrauch in Mikrofluidiksystemen

Wir verglichen den O_2 -Verbrauch von Lungenendothelzellen (ECs) und hoch aktiven Hepatozyten (HEP) in Mikrofluidik-Chips aus PDMS und COC. Parallel hierzu wurde der O_2 -Verbrauch beider Zelllinien in COC und PDMS numerisch simuliert (**Abb. 3A–D**). Für die experimentelle Durchführung wurden die Mikrofluidiksysteme jeweils mit einer der beiden Zelllinien angeimpft und über zwei Tage in einem regelbaren Inkubator (5 % CO_2 , 37 °C) kultiviert, während VisiSens den O_2 -Verbrauch kontinuierlich aufzeichnete. Hepatozyten zeigten dabei einen sehr hohen O_2 -Verbrauch und erschöpften den vorhandenen Sauerstoff im undurchlässigen COC-Chip innerhalb einer Stunde (3 %, **Abb. 3E–G**), also vergleichbar mit den Simulationsergebnissen. Bei der HEP-Kultur in den dünnen PDMS-Chips, in denen leicht Sauerstoff aus der Umgebung nachgeliefert werden kann, stellte sich nach vier Stunden ein stabiler O_2 -Gehalt zwischen 15 und 17 Prozent ein (**Abb. 3H–J**). Die Dicke von PDMS über den Kanälen hat nachweislich einen signifikanten Einfluss auf Sauerstoffniveaus, und so erreichte der O_2 -Gehalt bei der HEP-Kultur in fünf Millimeter dicken PDMS-Chips nur 11,5 Prozent. Die Daten lassen vermuten, dass COC-Chips für die Zellkultur von Hepatozyten unter hypoxischen Bedingungen, PDMS-Chips bestimmter

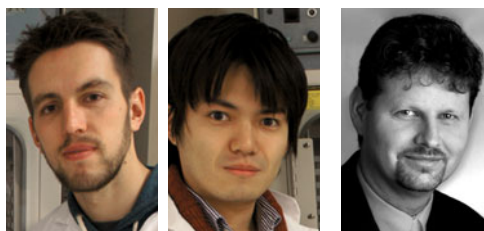
Dicke hingegen für Kulturen mit mittlerem O_2 -Gehalt geeignet sind. Für Endothelzellen wurde ein nur mäßiger O_2 -Verbrauch erwartet, was sowohl in beiden Simulationen als auch bei Messungen in Chips mit Sensorfolie bestätigt wurde. Beide Materialien scheinen also für die normale Kultur dieser Zelllinie geeignet.

Eine Kombination mit Potenzial

Bei Untersuchungen in einem bereits charakterisierten Hypoxia-Chip zeigte VisiSens gute Detektionseigenschaften und ein Potenzial für Mikrofluidik-Anwendungen. Die Biokompatibilität der Sensorfilme und die nicht-invasive Funktionsweise des Imaging-Systems ermöglichen es, nicht nur den zellulären Sauerstoffverbrauch in Mikrofluidiksystemen aufzuzeichnen, sondern auch geeignete Chip-Materialien je nach Anwendungen und Zelllinien zu bestimmen. Die Sauerstoff-wahnehmenden Mikrofluidik-Chips könnten künftig beispielsweise für Wirkstoffscreenings eingesetzt werden. Durch die Weiterentwicklung der VisiSens-Geräte und die Möglichkeit, auch weitere Parameter (pH und CO_2) aufzeichnen zu können, eröffnen sich vielseitige neue Anwendungen im Bereich der Mikrofluidik. ■

Literatur

- [1] Abaci HE, Truitt R, Luong E et al. (2010) Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C1527–C1537
- [2] Abaci HE, Devendra R, Smith O et al. (2012) Design and development of micro-bioreactors for long-term cell culture in controlled oxygen microenvironments. *Biomed Microdevices* 14:145–152
- [3] Ochs CJ, Kasuya J, Pavesi A et al. (2014) Oxygen levels in thermoplastic microfluidic devices during cell culture. *Lab Chip* 14:459–462
- [4] Funamoto K, Zervantonakis IK, Liu Y et al. (2012) A novel microfluidic platform for high-resolution imaging of a three dimensional cell culture under a controlled hypoxic environment. *Lab Chip* 12:4855–4863
- [5] Jeon JS, Chung S, Kamm RD et al. (2011) Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform. *Biomed Microdevices* 13:325–333



Christopher J. Ochs, Junichi Kasuya und Gregor Liebsch (v. l. n. r.)

Korrespondenzadressen:

Dr. Christopher J. Ochs
UCSF School of Pharmacy
Department of Bioengineering
1700 4th Street
San Francisco CA 94143, USA
Christopher.Ochs@ucsf.edu

Dr. Gregor Liebsch
PreSens Precision Sensing GmbH
Josef-Engert-Straße 11
D-93053 Regensburg
Gregor.Liebsch@presens.de