

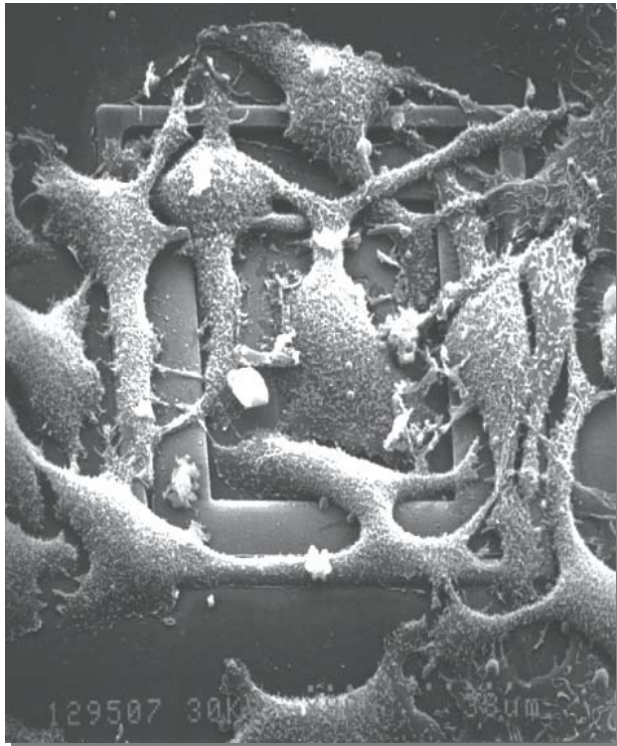
# Cytotoxizität

Dr. Martin Brischwein

Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

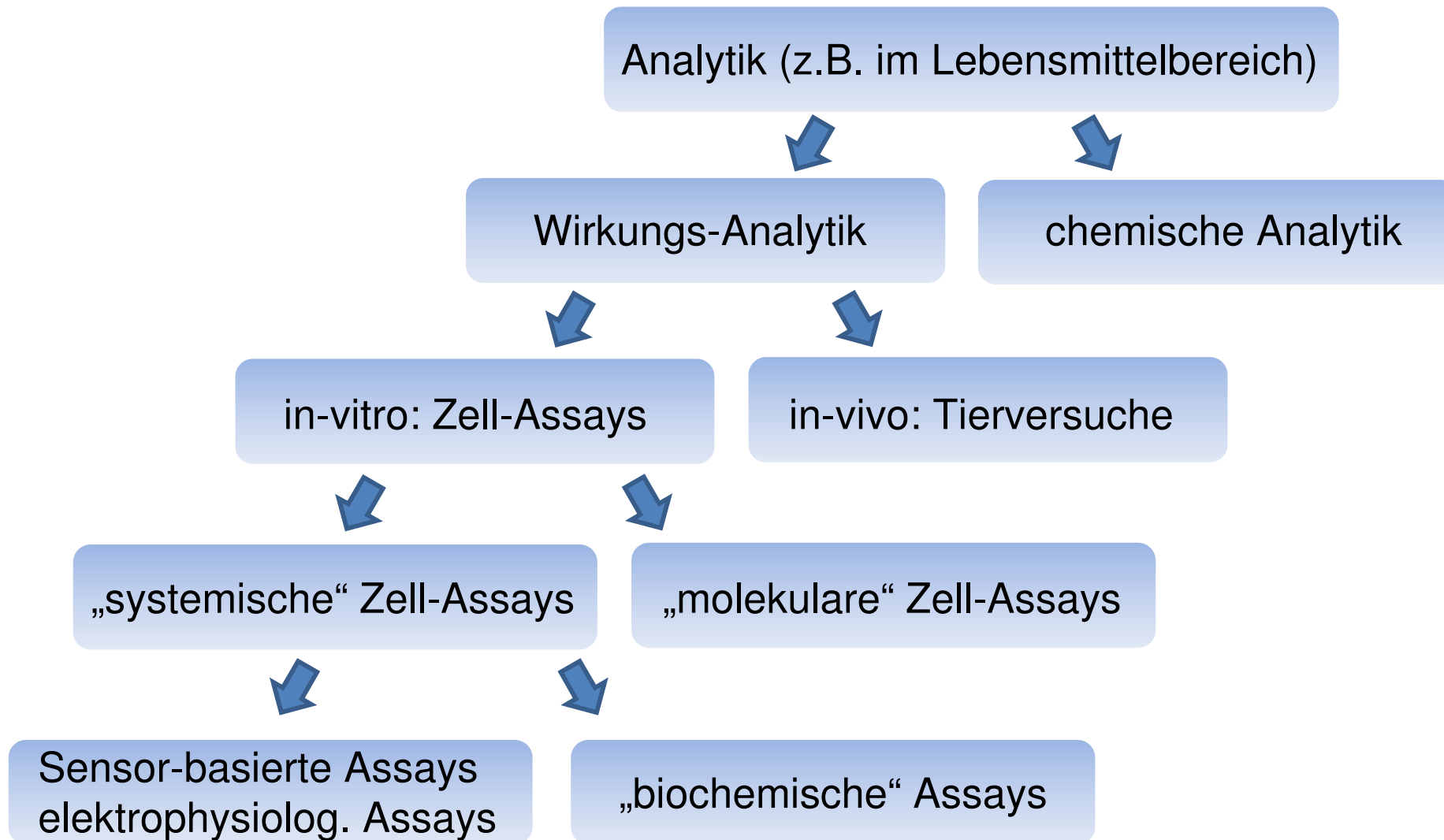
Technische Universität München  
Theresienstr. 90, Geb N3, 80333 München, Germany  
[www.lme.ei.tum.de](http://www.lme.ei.tum.de)

„cell on chip“



Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik  
Prof. Bernhard Wolf

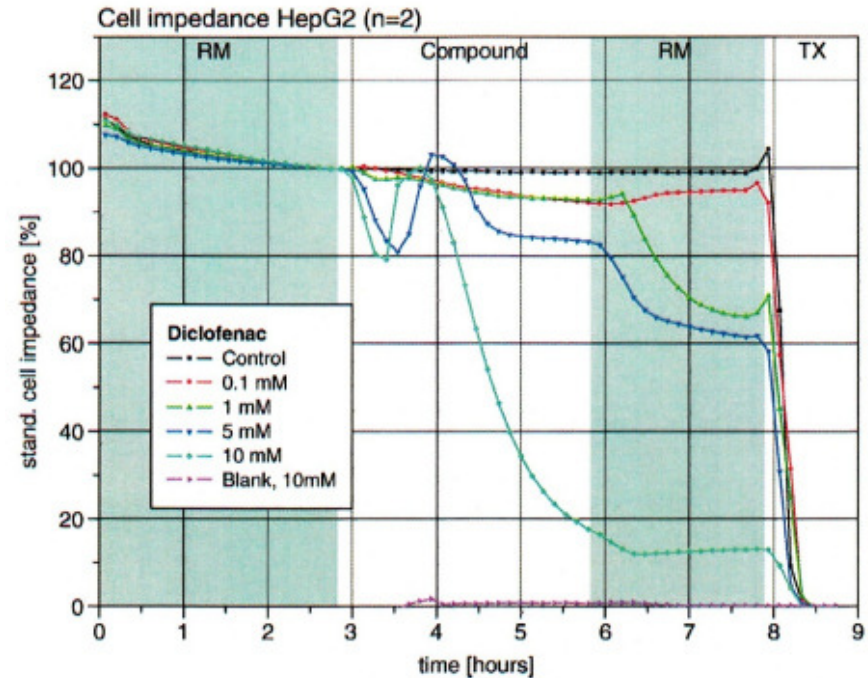
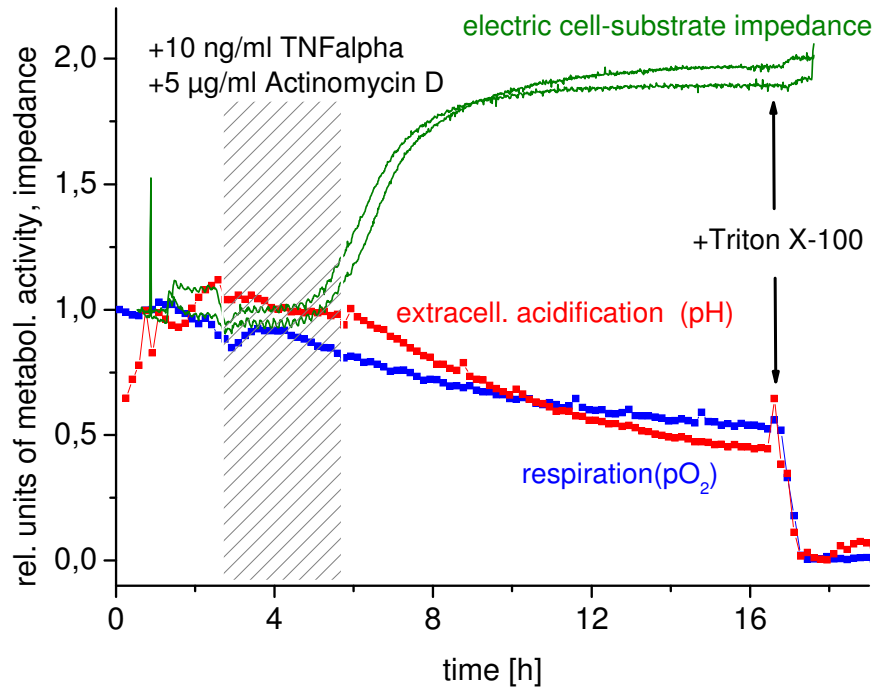
Technische Universität München



## Mögliche Vorteile (Kennzeichen) Sensor-basierter Zell-Assays

- Ersparnis von Zeit, Kosten (und möglicher Probleme) bei der Markierung/Farbstoff-Beladung von Zellen
- Dynamik einer Zell-Reaktion wird leichter sichtbar (dynamische  $IC_{50}$ -Werte, evtl. verbesserte statistische Aussagekraft, Hinweise auf Wirkungsmechanismus, Untersuchung von Erholungs-Effekten bei zytotoxischen Schäden innerhalb einzelner Testläufe)
- Wenig spezifisch: Auch ohne a prior Wissen über involvierte Wege der Signaltransduktion anwendbar
- Multiparametrische Ansätze bieten sich an

# Möglicher Nutzen kinetischer, multiparametrischer Assays



aus: E. Thedinga et al., Online Monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects, Toxicology and Applied Pharmacology 220 (2007), 33-44

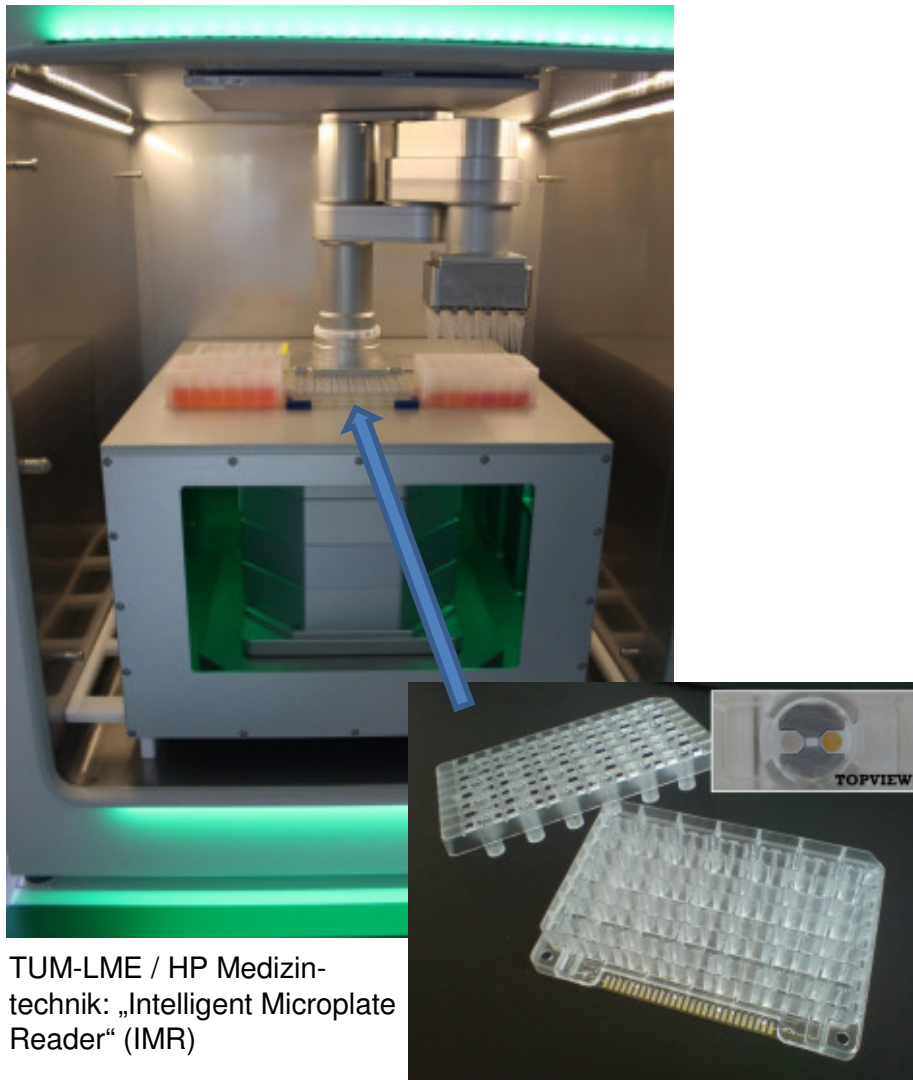
## Wie für alle anderen Zell-Assays gilt auch hier: Über die Sensitivität bei Zell-Assays ( $IC_{50}$ -Werte) bestimmen:

- Zell-Modell
- Konzentration, Expositionszeit (und gegebenenfalls: Post-Expositionszeit) des Wirkstoffes
- Assay-Methode

## Mögliche und bisher verwendete „Endpunkte“ (Meßparameter) Sensor-basierter Zell-Assays:

- Multi-Elektroden-Arrays (MEAs) für extrazelluläre Potentialableitungen
- Electric Cell Substrate Impedance Sensing (ECIS)
- Mikrometabolische Assays

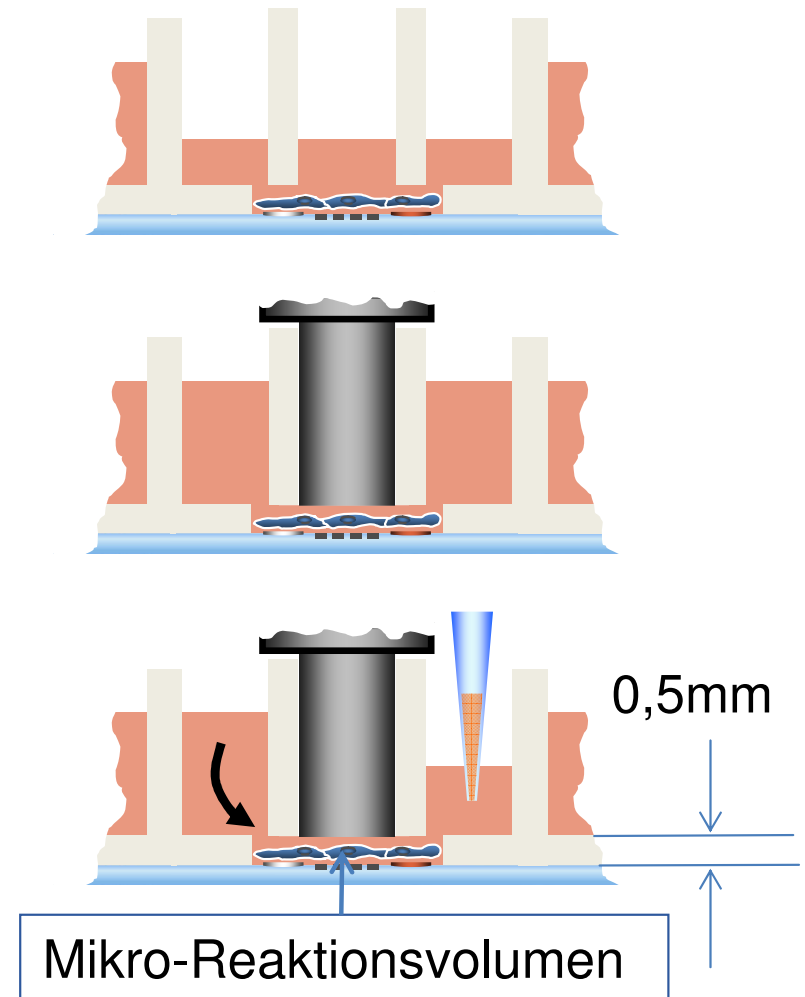
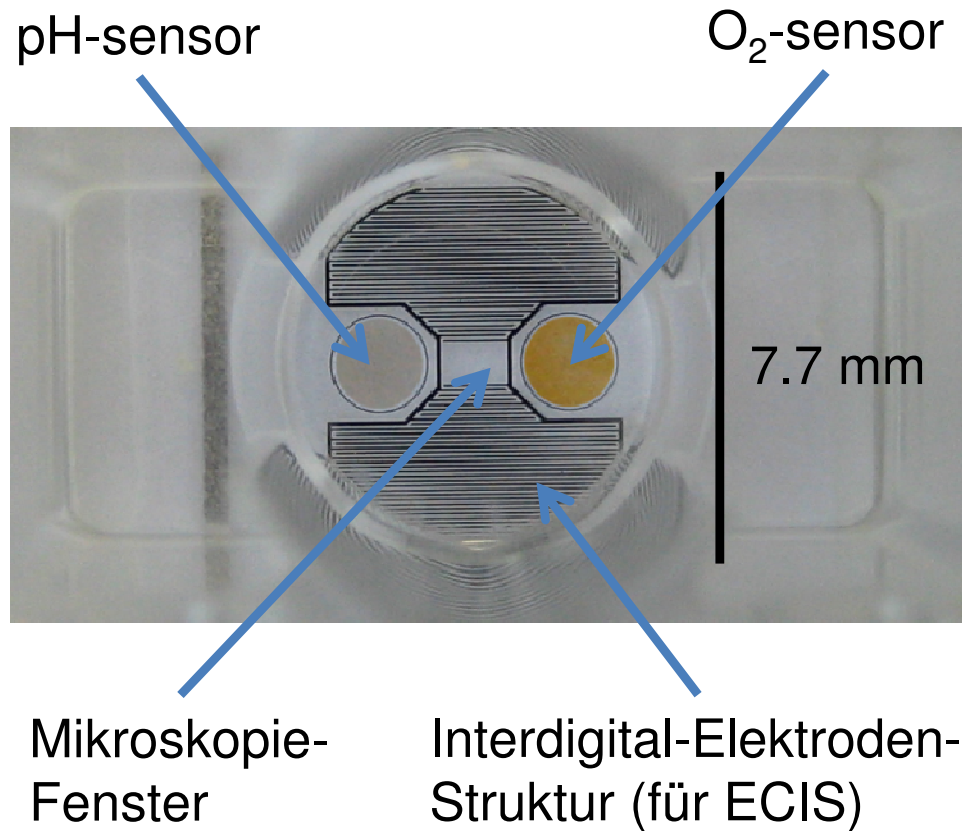
## Mikrometabolische Assays: Überblick



TUM-LME / HP Medizintechnik: „Intelligent Microplate Reader“ (IMR)

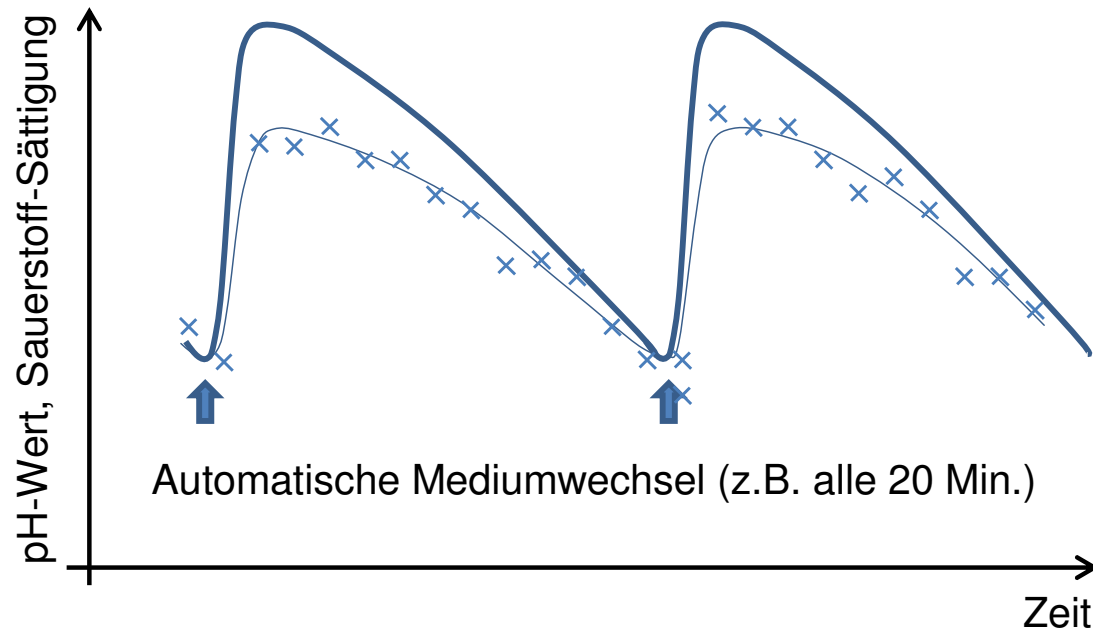
- Automatisierte, Sensor-basierte Zell-Assay Plattform
- 24-well Assay-Platten
- Je ein optochemischer pH- und O<sub>2</sub>-Sensor pro well
- Fluidik für regelmäßige Medienwechsel, Wirkstoffzugabe
- Klimatisierung
- Wahlweise: Mikroskopie
- Wahlweise: Impedanzmessung (ECIS)

# Mikrometabolische Assays: Fluidik

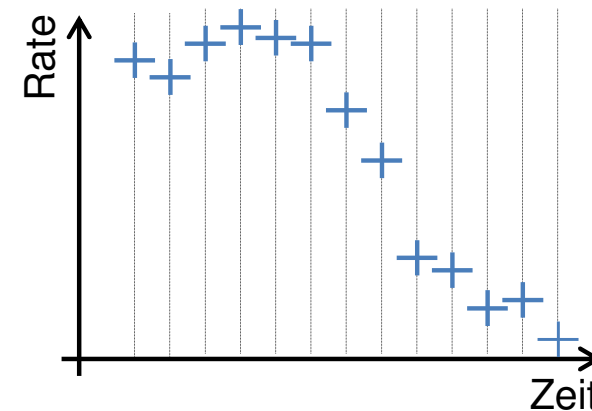
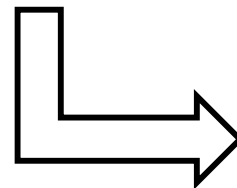




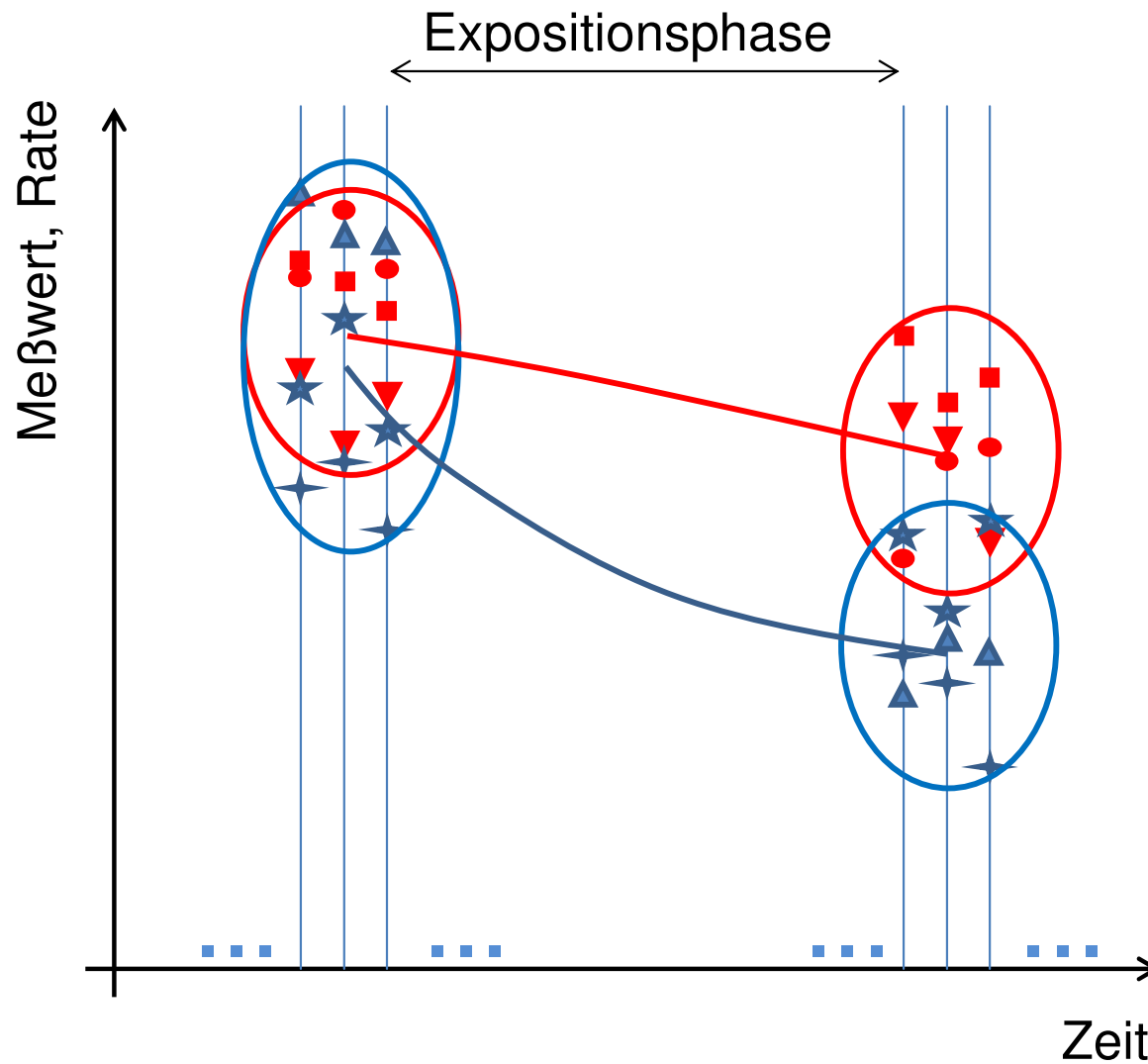
# Mikrometabolische Assays: Datenauswertung



- × Sensor-Meßwerte
- Mit FE-Modell angepasste Kurve  
Metabol. Rate/Diffusion/Sensoransprechzeit
- Mit FE-Modell angepasste Kurve  
Metabol. Rate/Diffusion:  
Vermutete reale Werte und reale Raten  
( $dpH/dt$ ,  $dO_2/dt$ )



# Mikrometabolische Assays: Datenauswertung



## Was ist die zellbiologische Aussagekraft der O<sub>2</sub>-Verbrauchs-Rate?

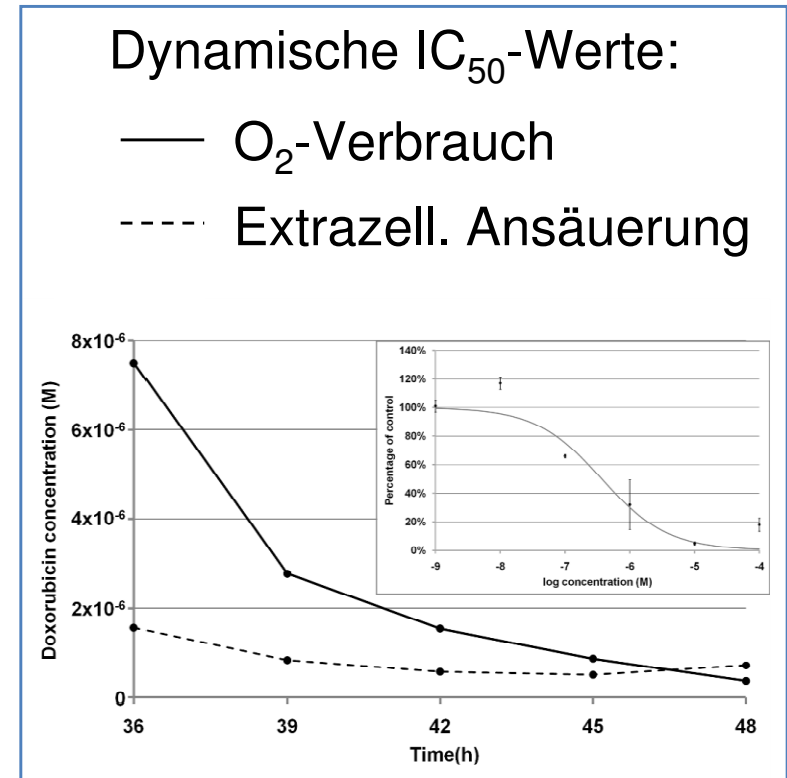
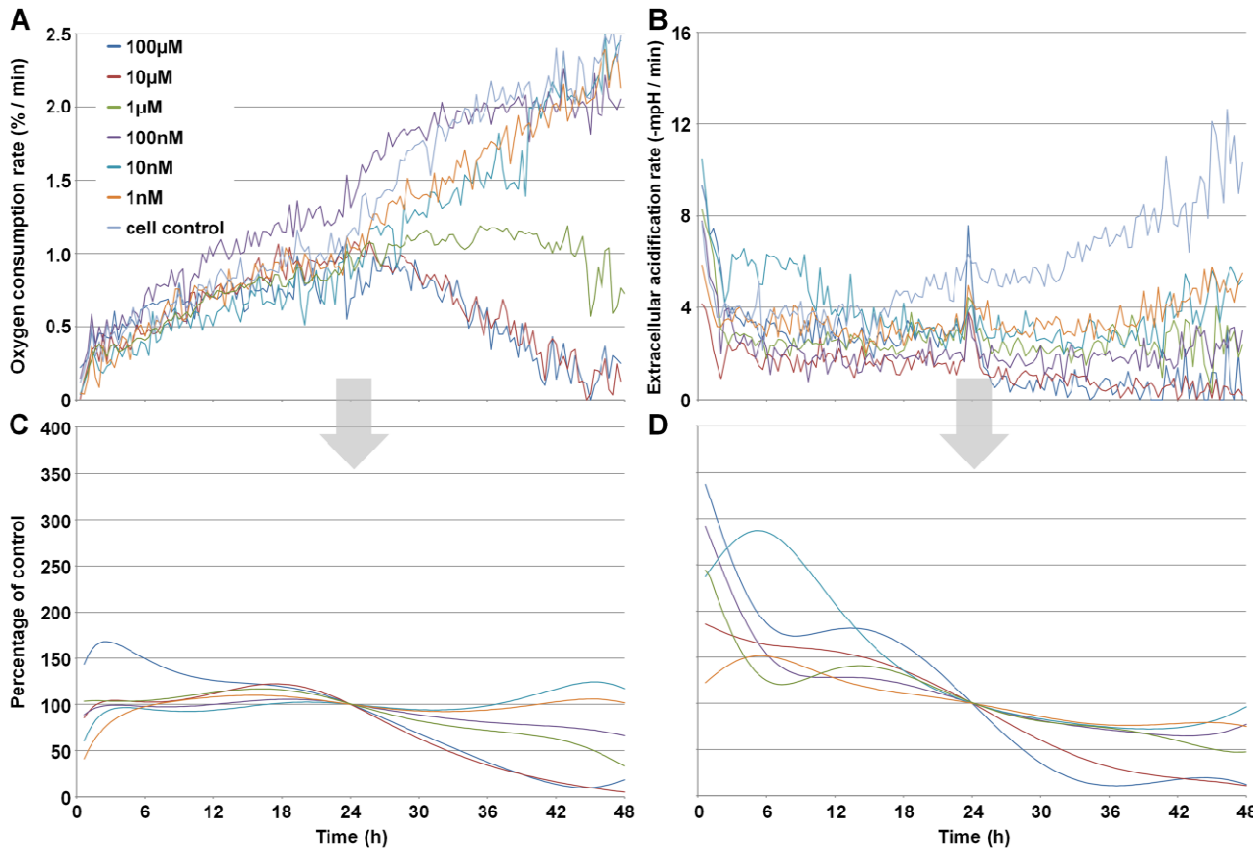
- Der Anteil mitochondrialer Atmung am gesamten O<sub>2</sub>-Verbrauch variiert mit Zelltyp und Bedingung zwischen annähernd 100% und lediglich etwa 10%
- Der Rest: basaler (ca. 0-10%) und anderer, nicht-mitochondrialer O<sub>2</sub>- Verbrauch
- Keine enge Korrelation zwischen O<sub>2</sub>-Verbrauch und anderen metabolischen Endpunkten (MTT u.a.)

## Was ist die zellbiologische Aussagekraft der extrazellulären Ansäuerungs-Rate?

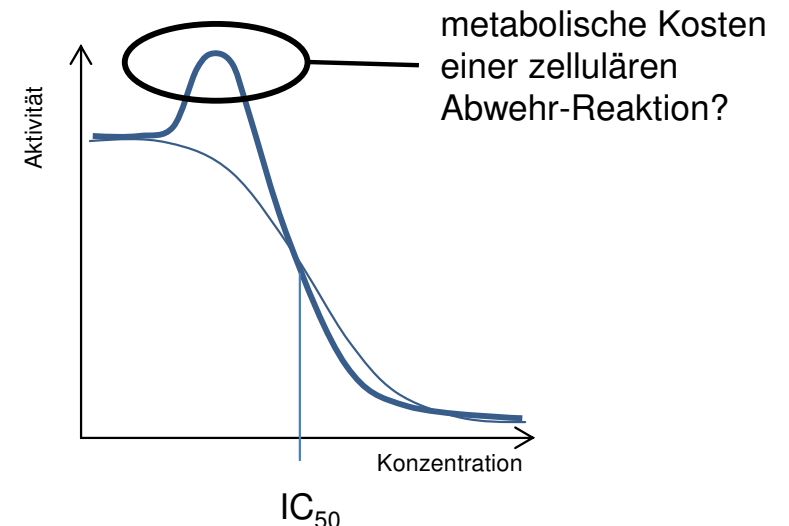
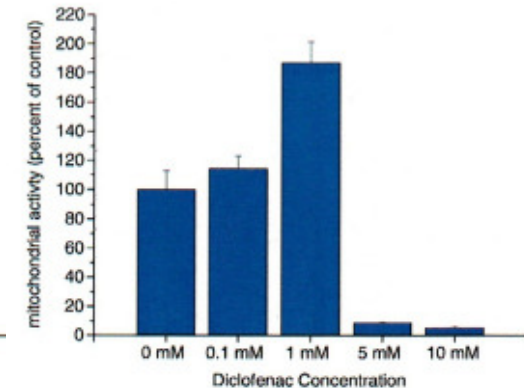
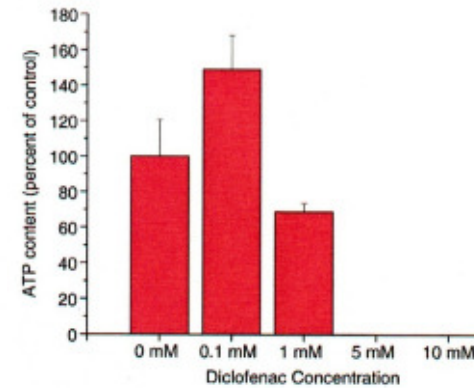
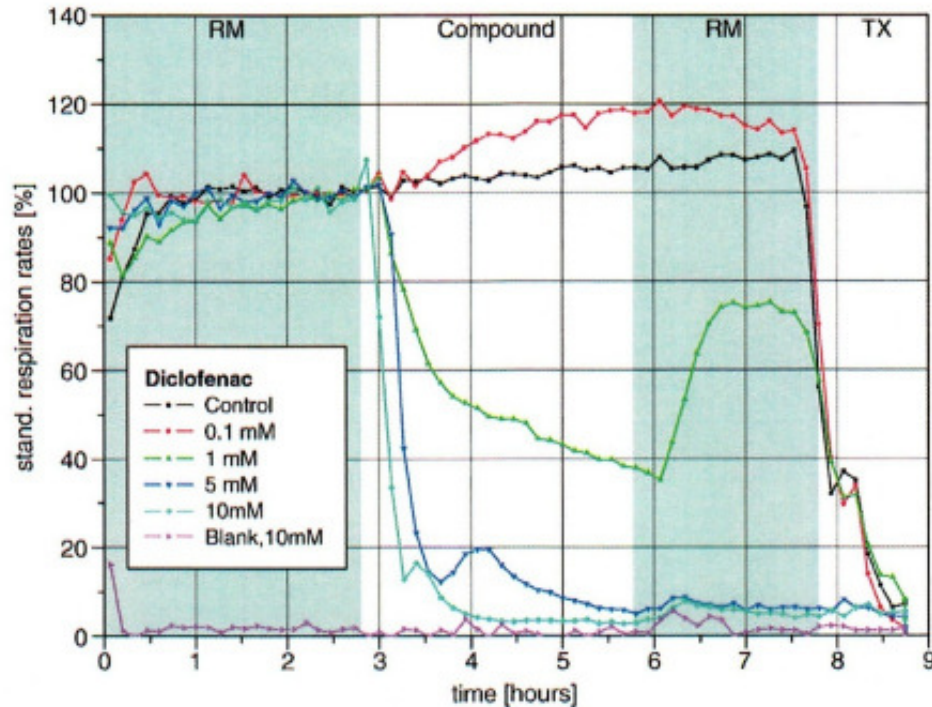
- Variable Beiträge (je nach Zelltyp und Milieu) von Laktat-Bildung (LDH), mitochondrialer Aktivität (CO<sub>2</sub>-Produktion) und anderer Stoffwechselwege

# Mikrometabolische Assays: Doxorubicin + MCF-7 Zellen

## Dynamische IC<sub>50</sub>-Werte



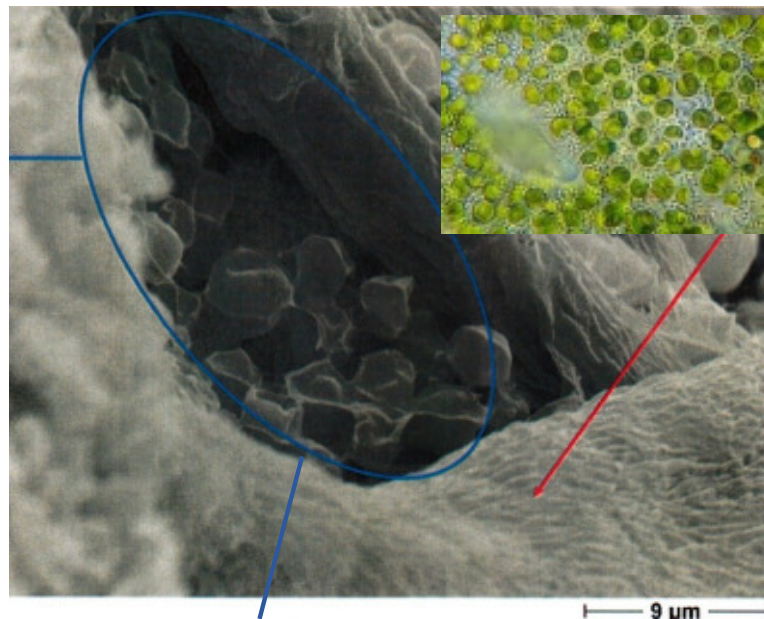
# Mikrometabolische Assays: Diclofenac + HepG2 Zellen metabolische Stimulation bei niedrigen Toxigen-Konzentrationen



aus: E. Thedinga et al., Online Monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects, Toxicology and Applied Pharmacology 220 (2007), 33-44

# Mikrometabolische Assays: Herbizid Diuron + Einzell. Algen

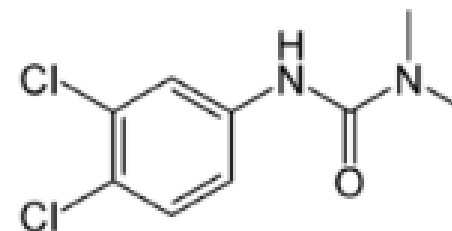
	ADI (mg/kgbw·d)	Chem. Analyse: Min. detektierb. Konzentration (mg/kg)	MRL (mg/kg)	Nachweis (Sensor- basierter Test) (mg/kg)
Diuron	0,007	0,0001	0,05 ... 0,1	0,005 mg/L detektierbar (Mikrometabol.)



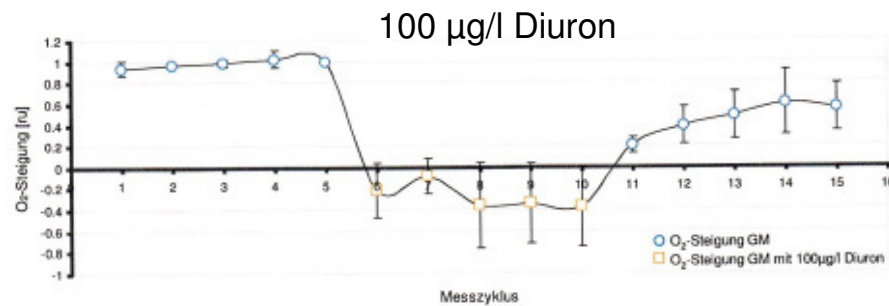
Zellulosefilter

Chlorella kessleri in der Filterstruktur

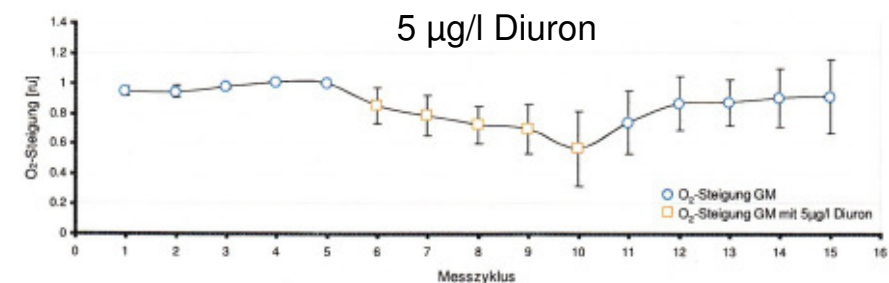
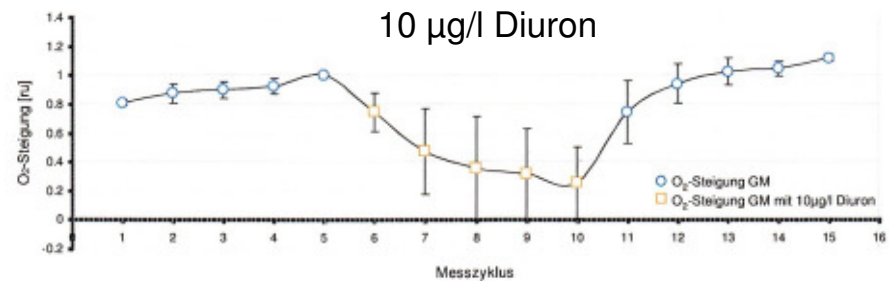
## Diuron (Totalherbizid)



# Mikrometabolische Assays: Herbizid Diuron + Einzell. Algen



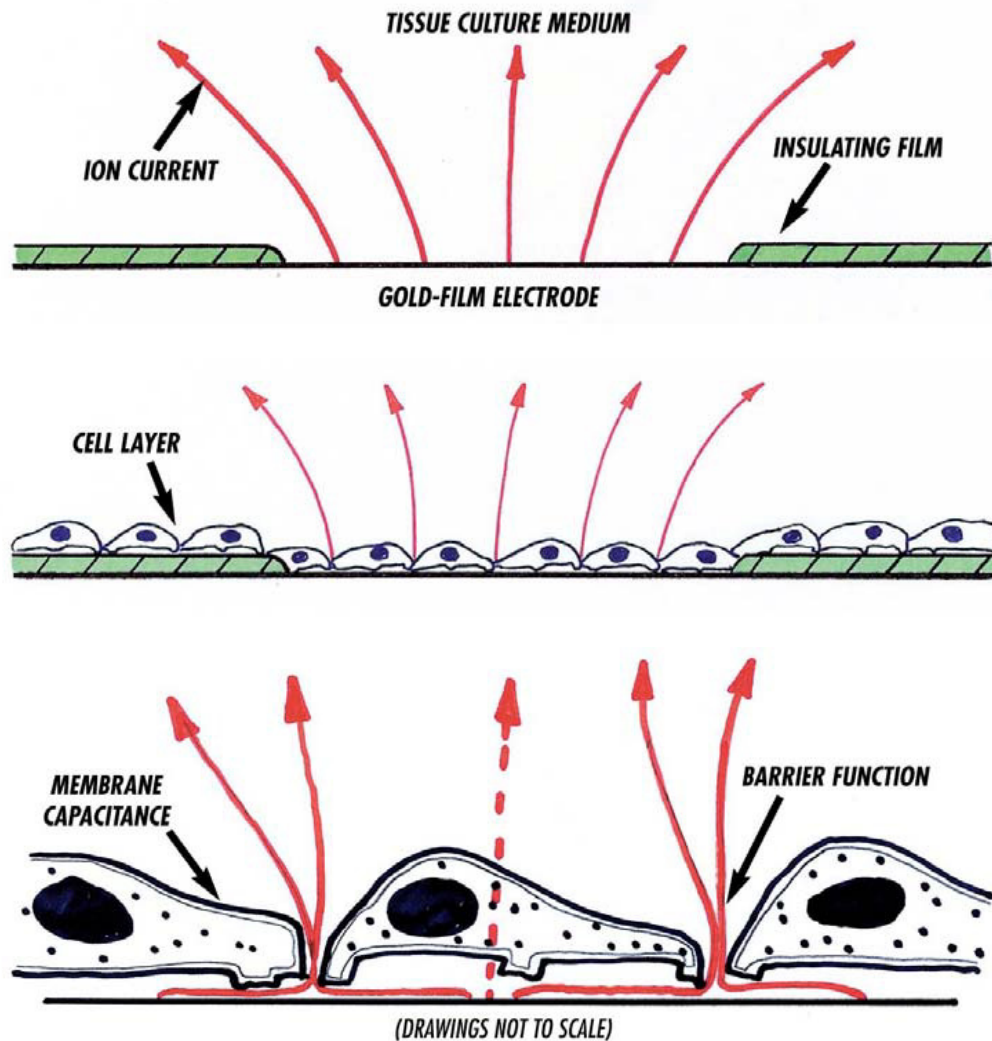
Sauerstoff-Austausch hier:  
Photosynthese, also O<sub>2</sub>-Abgabe  
in das Medium!



aus: Thorsten Stadthagen: Entwicklung eines online-Gewässermonitoring-Systems mittels Biosensorchips zum Nachweis ausgewählter Xenobiotika. Dissertation an der TUM, 2007



# Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)



≈ 10 kHz Frequenz

≈ 10 mV Anregungs-Amplitude

Isolierende Eigenschaften  
der Membranen **adhärenter**  
Zellen

Parameter „Zellwachstum“ und  
„Zellproliferation“

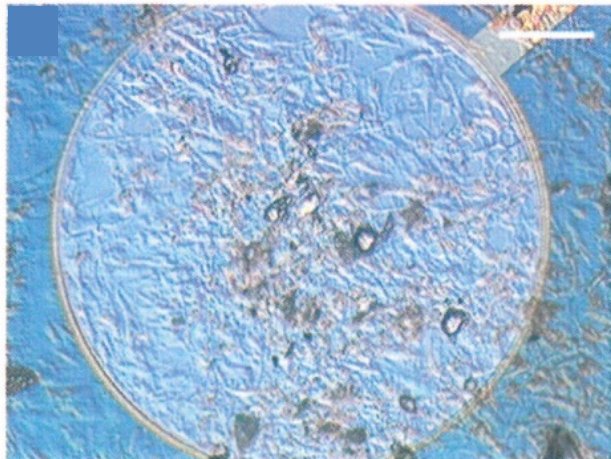
Parameter „Zellmorphologie“:  
Über das Zytoskelett eng  
verschaltet mit zellulärer  
Signalverarbeitung

Übernommen von: Applied Biophysics, Inc.

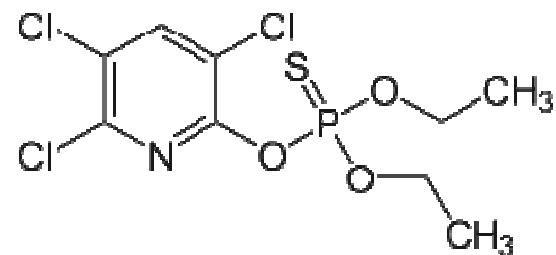


# Electric Cell-Substrate Impedance Sensing: Chlorpyrifos + Humane mesenchymale Stammzellen

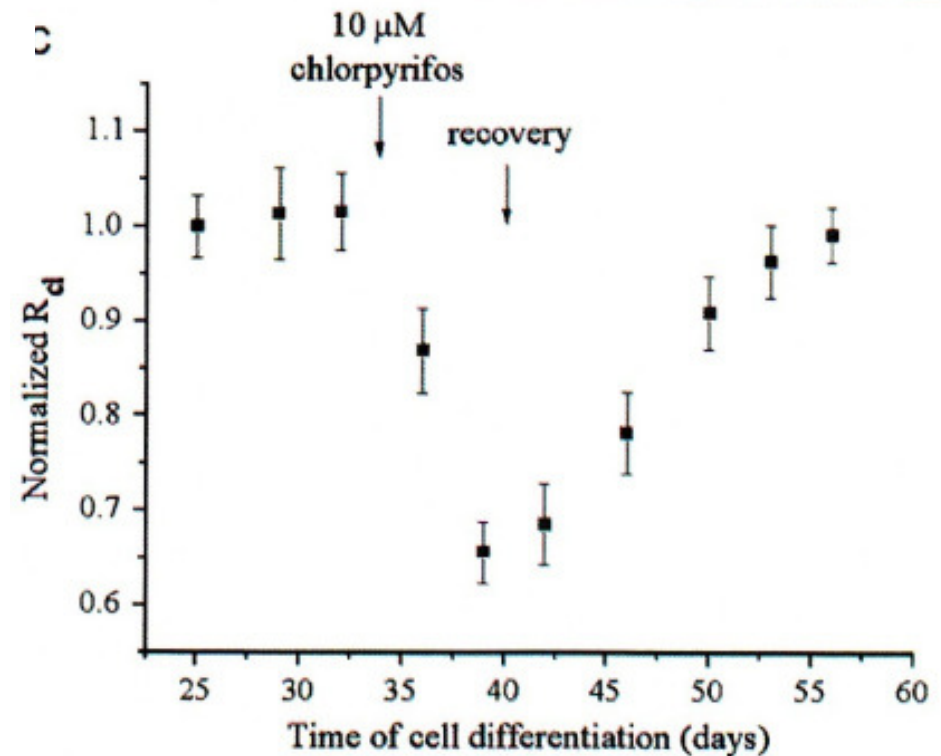
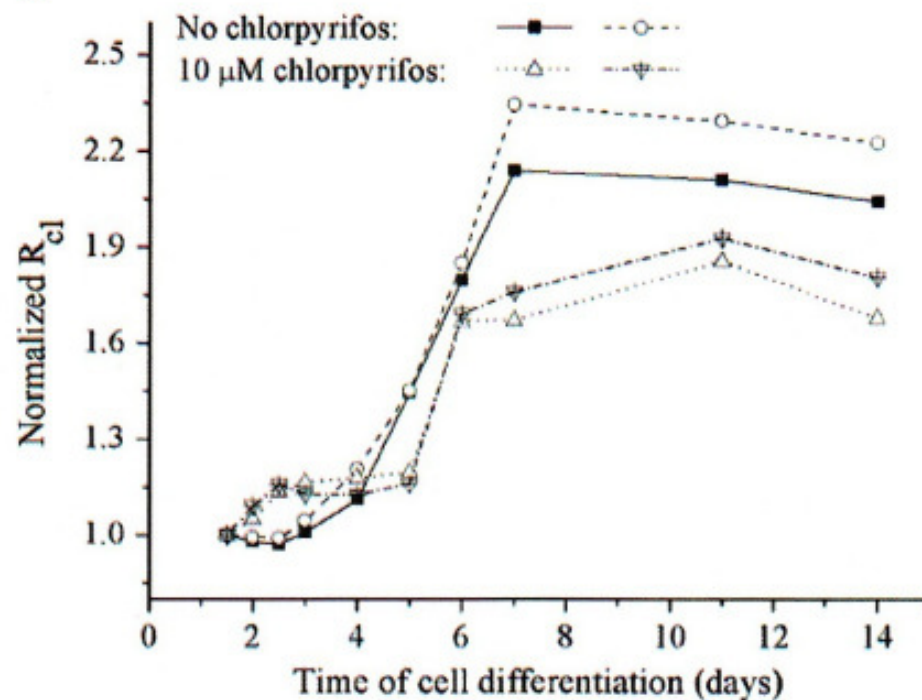
	ADI (mg/kgbw·d)	Chem. Analyse: Min. detektierb. Konzentration (mg/kg)	MRL (mg/kg)	Nachweis (Sensor-basierter Test) (mg/kg)
Chlorpyrifos	0,01	0,001	0,05 (Nüsse) ... 0,5 (Obstsorten) 2,0 (Mandarinen)	<3,5 mg/L detektierbar (ECIS)



## Chlorpyrifos

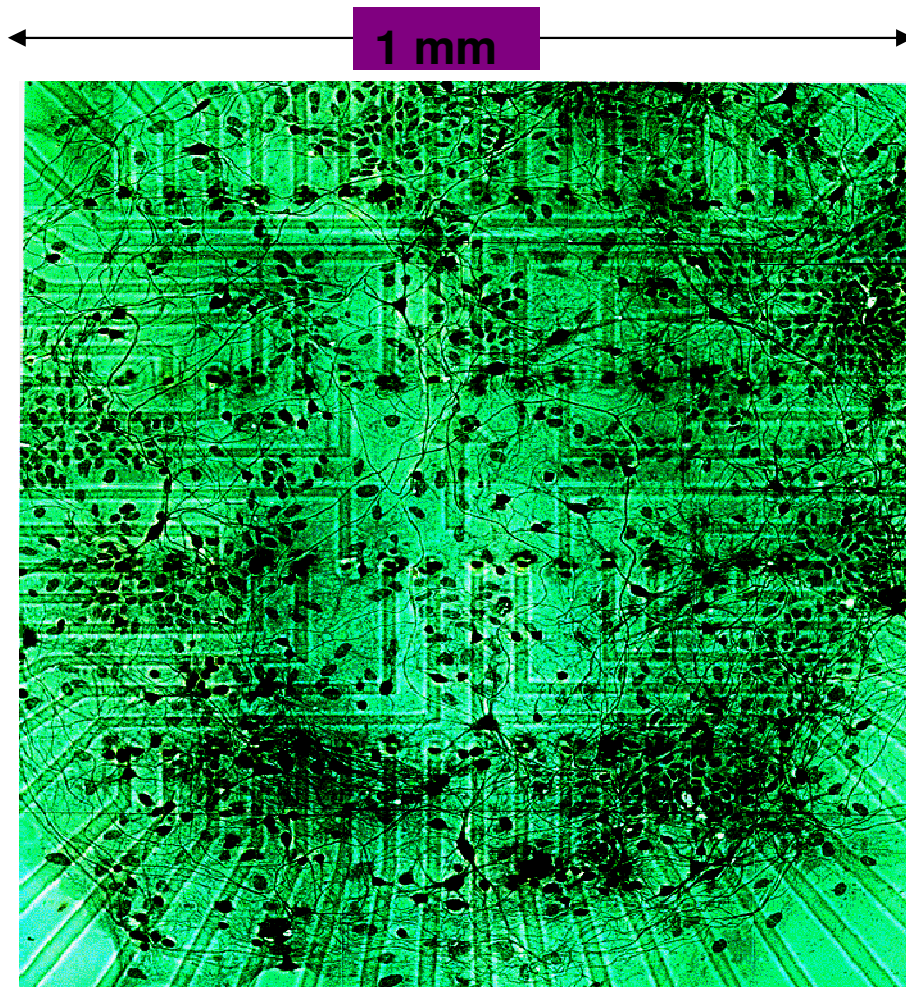


# Electric Cell-Substrate Impedance Sensing: Chlorpyrifos + Humane mesenchymale Stammzellen



aus: S. Cho, E. Gorjup, H. Thielecke: Chip-based time-continuous monitoring of toxic effects on stem cell differentiation, Ann. Anat. 191 (2009), 145-152

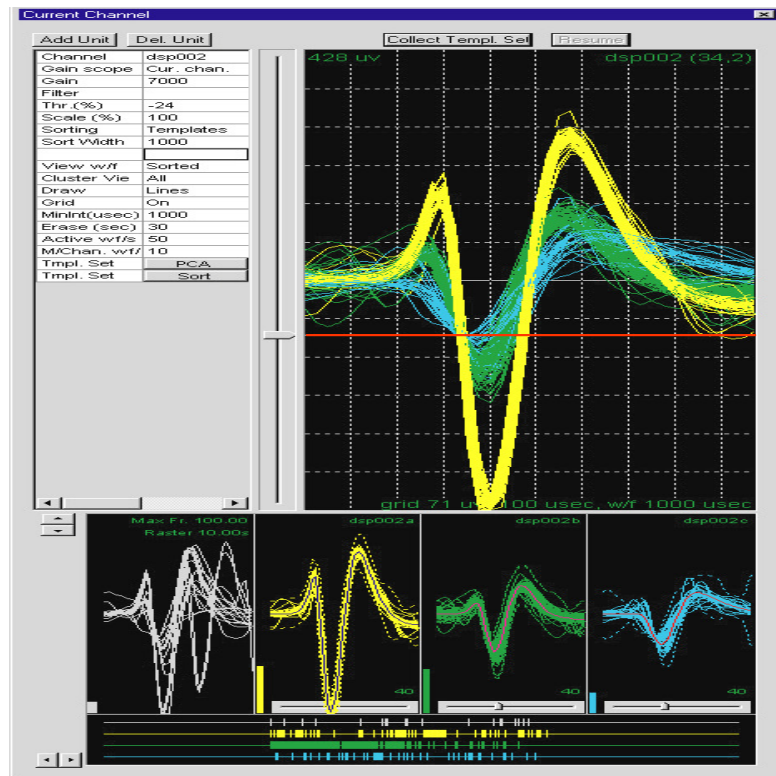
# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen



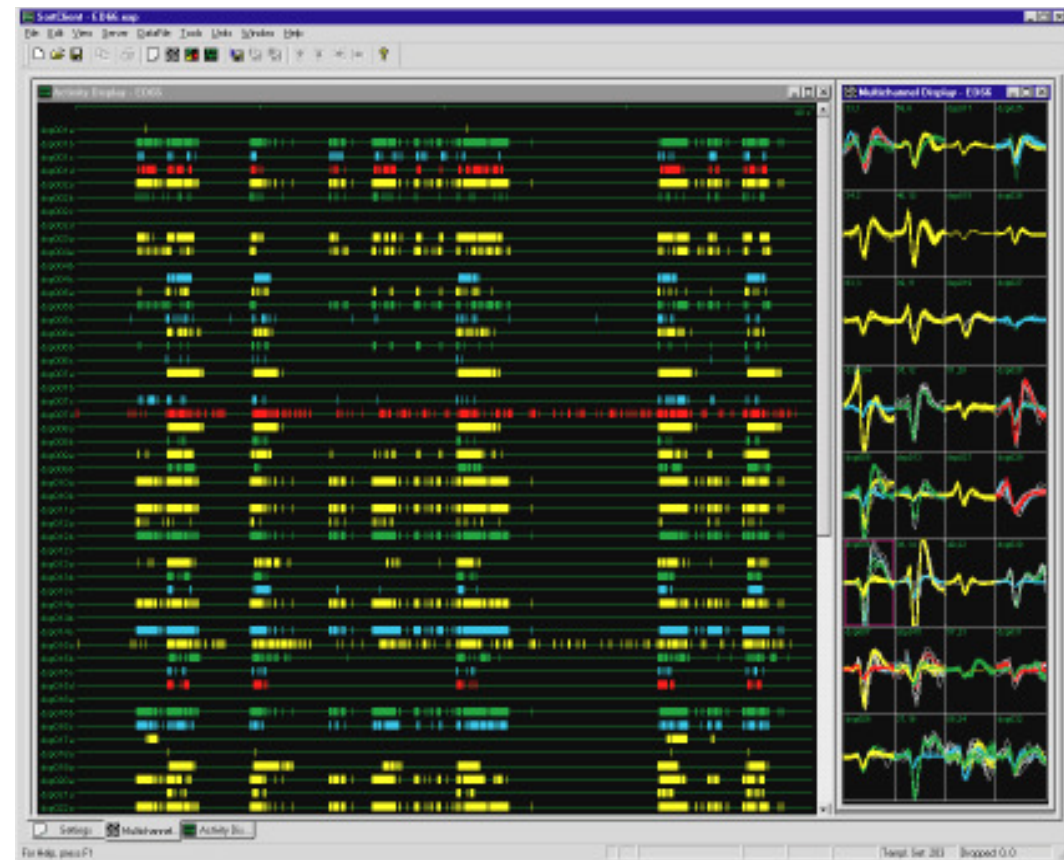
Bildquelle: Guenter W. Gross, UNT

- Primäre Zellkulturen aus embryonalen Nervengeweben (Maus, Ratte)
- Selbstorganisierte Bildung spontan-aktiver Netzwerke ("brain on chip")
- Extrazelluläre Ableitung von Potential-Transienten (Ionenverschiebungen)
- Typisch: > 1 Monat Aktivität, Messung von Einzelimpuls-Formen, Spike-Raten, Burst-Raten
- Organ-spezifisches Testsystem: Subtile Veränderungen von elektrischen Signalmustern treten potentiell bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen ein.

# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen



Bildquelle: Guenter W. Gross, UNT



Bildquelle: Guenter W. Gross, UNT

„Spikes“ (einzelne Aktionspotentiale) und „Bursts“ (Aktionspotential-Cluster)

## Comparison of ethanol effects on mammals and FC cultures (Frontal Cortex)

<b>Mammal</b>	<b>Conc. (mM)</b>	<b>Effect</b>
humans	5-15	slight impairment of attention and judgment
humans	10-22	impairment of speech and balance
humans	15-30	significant sedation
<b>FC cultures</b>	<b>15</b>	<b>first overt change in spike and burst production</b>
rats	20	sedation
humans	30-55	mental confusion
mice	40	loss of righting reflex
<b>FC cultures</b>	<b>48.8</b>	<b>EC50 for spike production</b>
humans	100	coma and death
mice	120	coma, hypothermia
<b>FC cultures</b>	<b>100-110</b>	<b>cessation of all spontaneous activity</b>

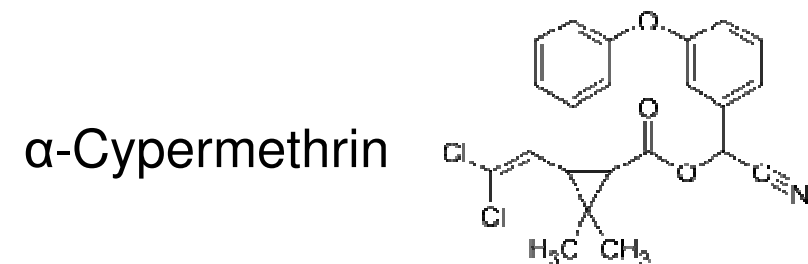
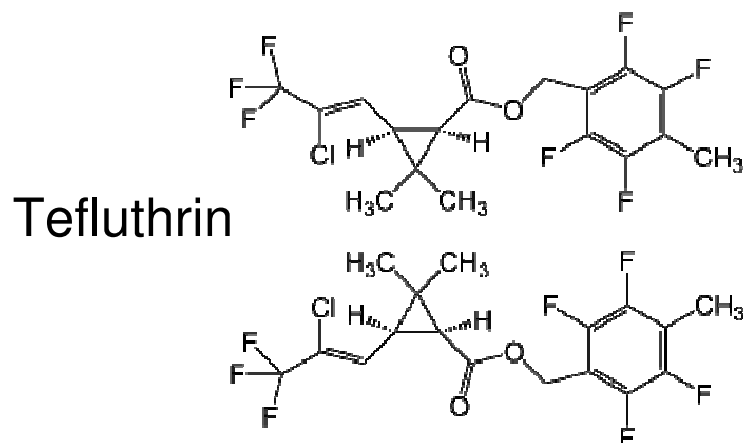
(human and animal data from Charness et al., 1989; Little, 1990).

Quelle: Guenter W. Gross, UNT



# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen

	ADI (mg/kgbw·d)	Chem. Analyse: Min. detektierb. Konzentration (mg/kg)	MRL (mg/kg)	Nachweis (Sensor-basierter Test) (mg/kg)
Tefluthrin			0,02 ... 0,05	< 4 mg/L detektierbar (MEA)
$\alpha$ -Cypermethrin	0,05	0,01	0,05 ... 2,0 30 (Hopfen)	< 4 mg/L detektierbar (MEA)
Tetramethrin		0,01		< 4 mg/L detektierbar (MEA)



# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen: Pyrethroid-Effekte auf Kardiomyozyten

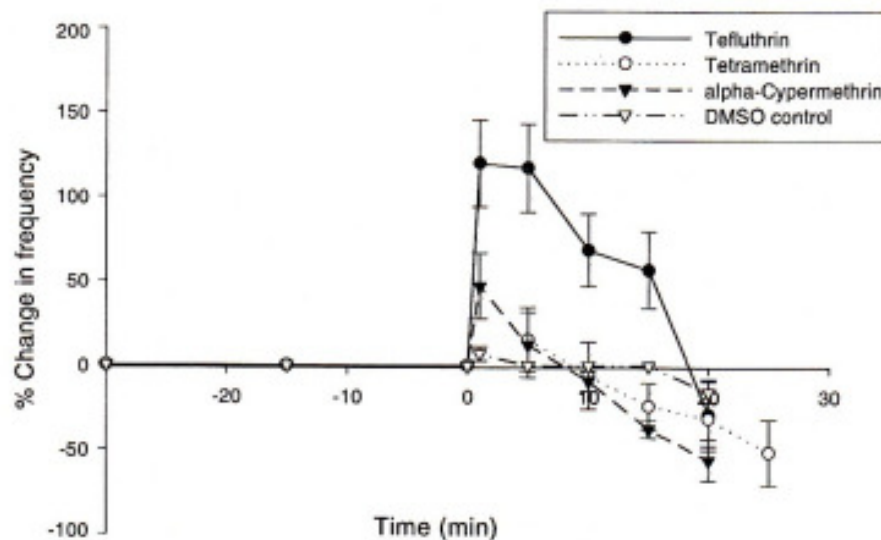


Fig. 2. Effect of pyrethroids on the spontaneous beating frequency of the cardiac myocytes. Chicken cardiac myocytes were cultured on the top of the substrate embedded electrodes for 4 days in vitro. Spontaneous action potentials were recorded with an extracellular multielectrode recording system. The effect of each Pyrethroid ( $10 \mu\text{M}$ ) was expressed as a percentage change in beating frequency compared to the baseline recorded before the administration of the drug (at time 0) (mean  $\pm$  SEM;  $n = 6$ ).

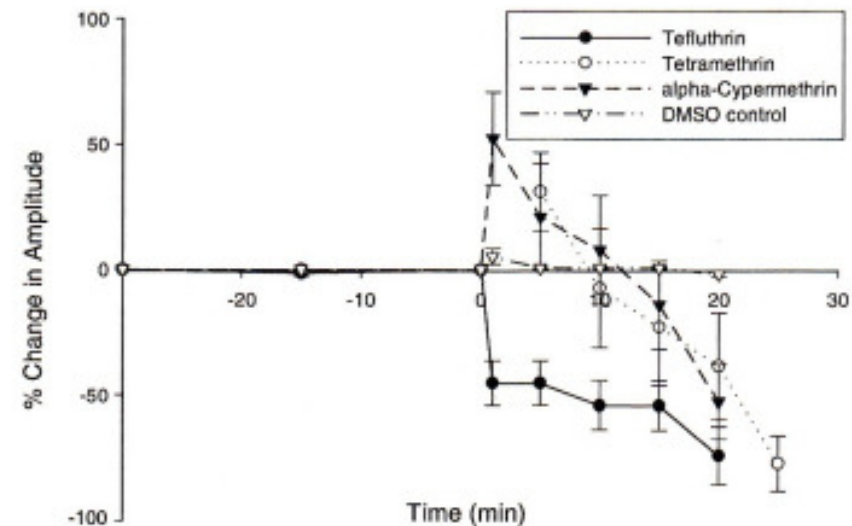
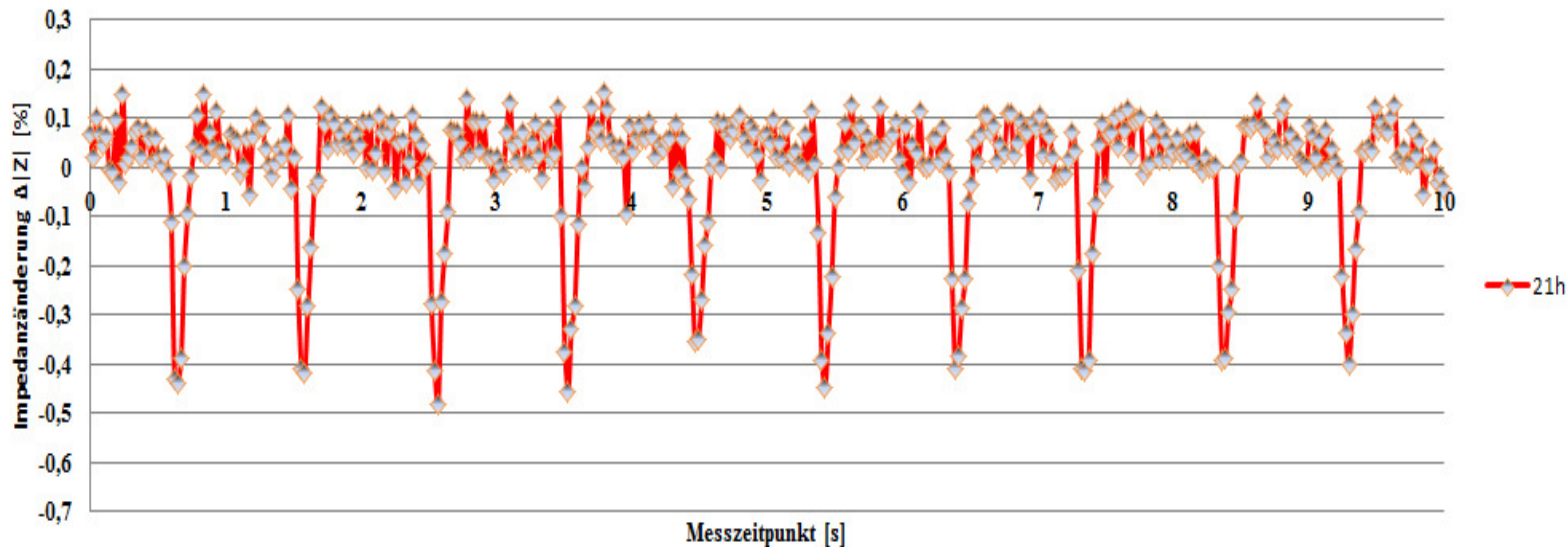


Fig. 3. Effect of the pyrethroids on the amplitude of the action potentials. Chicken cardiac myocytes were cultured on the top of the substrate embedded electrodes for 4 days in vitro. Spontaneous action potentials were recorded with an extracellular multielectrode recording system. Pyrethroid effect was expressed as percentage change in the amplitude of the action potentials compared to the baseline recorded before the administration of the drug (at time 0) (mean  $\pm$  SEM;  $n = 6$ ).

aus: A. Natarajan, P. Molnar, K. Sieverdes, A. Jamshidi, J.J. Hickman, Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. *Toxicology in vitro* 20 (2006), 375-381

## Auch möglich bei (Kardio-)Myocyten: Schnelle Morphometrie mit ECIS anstelle Potentialableitung mit MEA



aus: Tobias Schwarzenberger, Dissertation an der TUM (unveröffentlichte Daten)

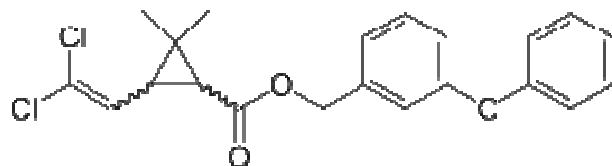
Schlagmuster von Kardiomyocyten nach 21 h Kultur, detektiert mit ECIS, Punkt-Elektrode, 10 kHz, Abtastung alle 24 ms: Durch Zellkontraktionen mit einer Amplitude von 1-2  $\Omega$  modulierte Basis-Impedanz der Elektroden von  $\approx 400 \Omega$



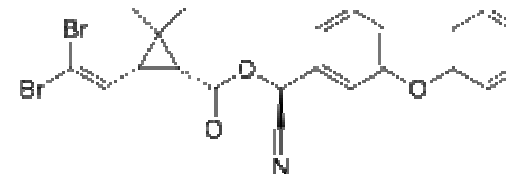
# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen: Pyrethroid-Effekte auf neuronale Netzwerke

	ADI (mg/kgbw·d)	Chem. Analyse: Min. detektierb. Konzentration (mg/kg)	MRL (mg/kg)	Nachweis (Sensor-basierter Test, Spike-Rate) (mg/kg)
Permethrin	0,05	0,01	0,05 ... 0,1	IC50: 2,6 mg/L (MEA)
Deltamethrin	0,01	0,003	0,05 ... 0,5 5,0 (Hopfen)	IC50: 0,065 mg/L (MEA)

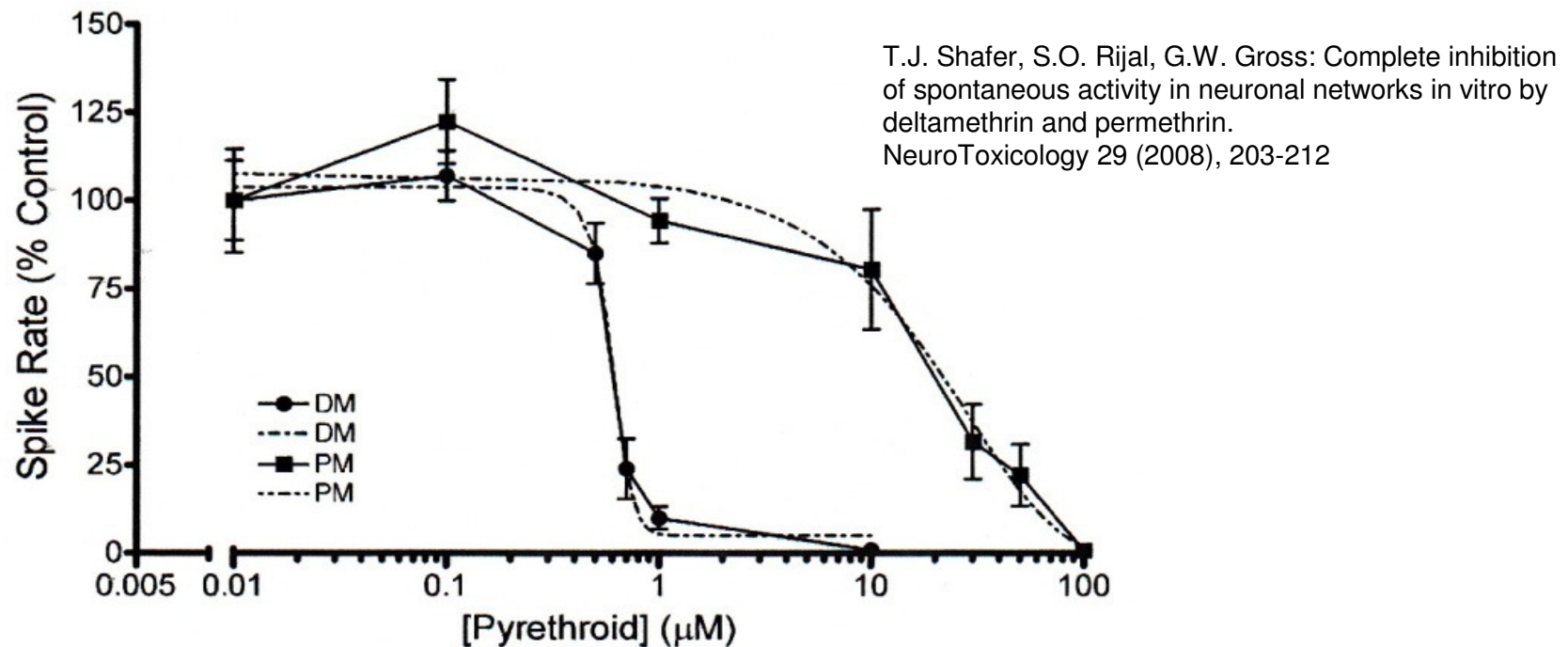
## Permethrin



## Deltamethrin

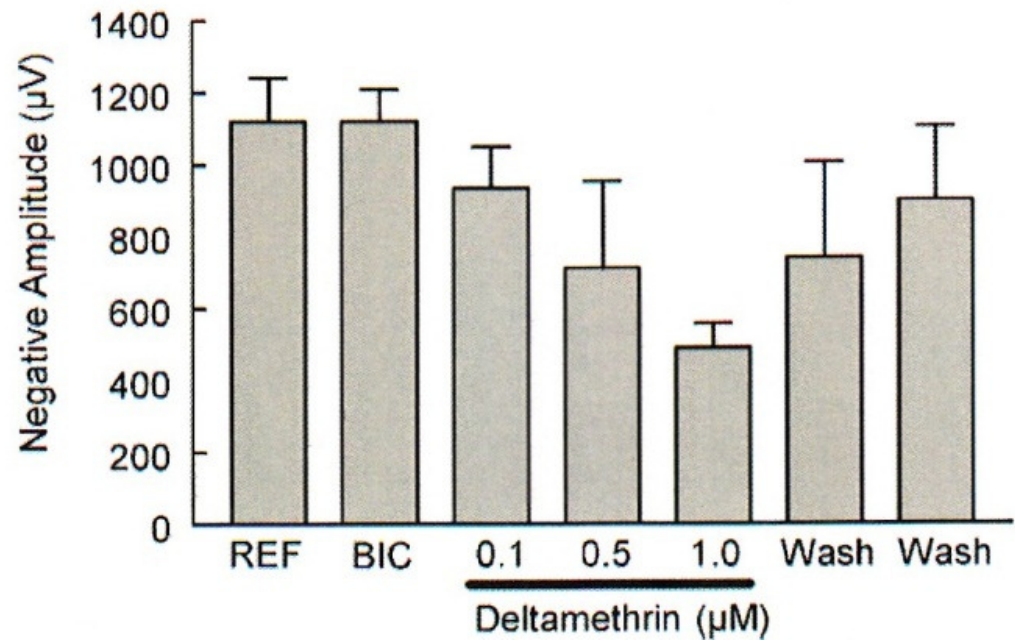
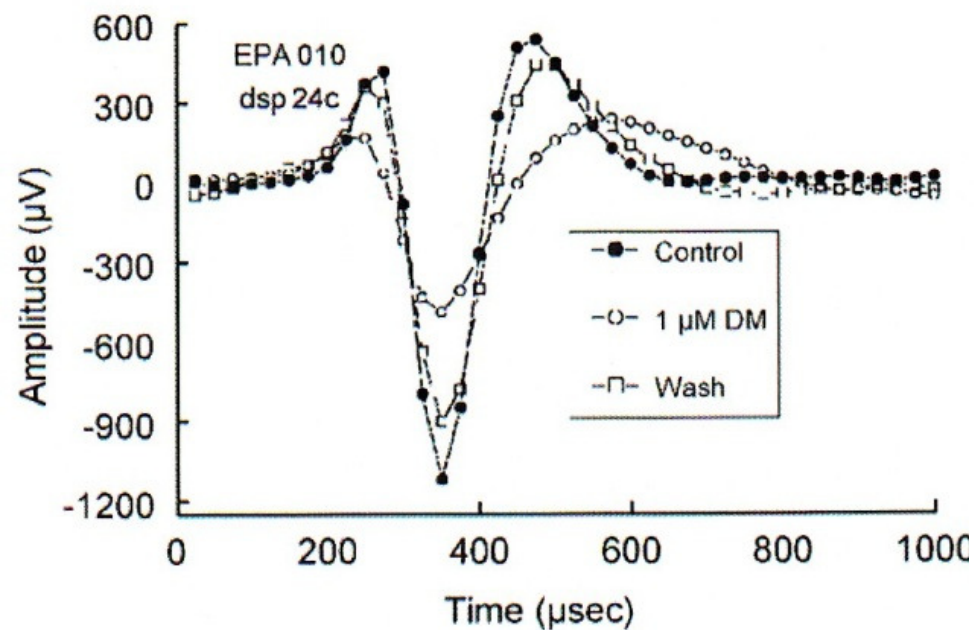


# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen: Pyrethroid-Effekte auf neuronale Netzwerke



Pyrethroide mit einer  $\alpha$ -cyano-Gruppe (z.B. Deltamethrin, DM) unterscheiden sich in ihrer akuten Wirkung von solchen ohne diese Gruppe (z.B. Permethrin, PM)

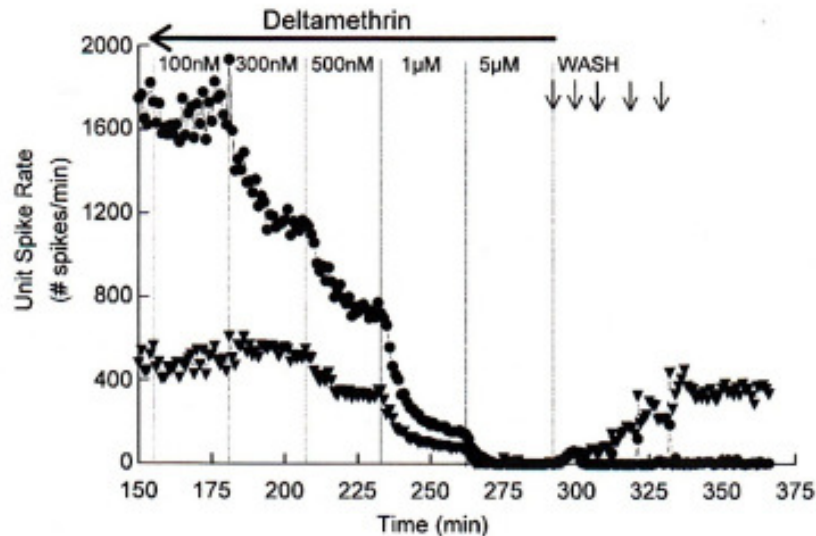
# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen: Pyrethroid-Effekte auf die Amplitude von Einzel-APs



T.J. Shafer, S.O. Rijal, G.W. Gross: Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. *NeuroToxicology* 29 (2008), 203-212

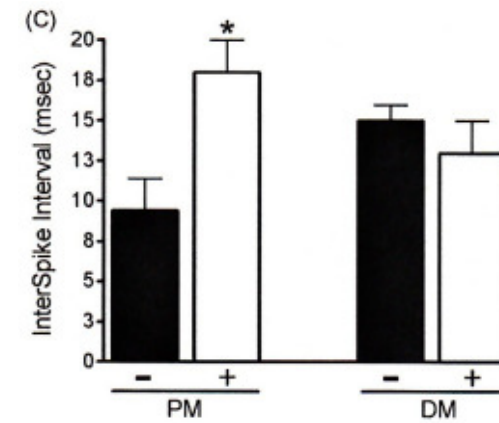
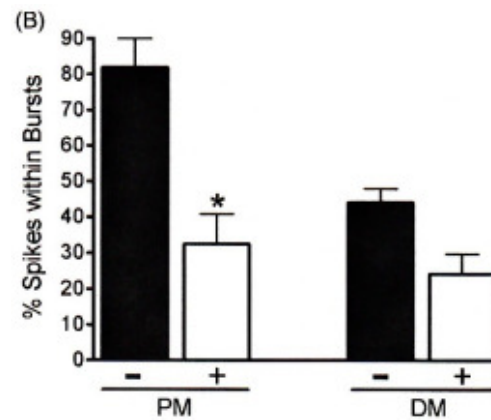
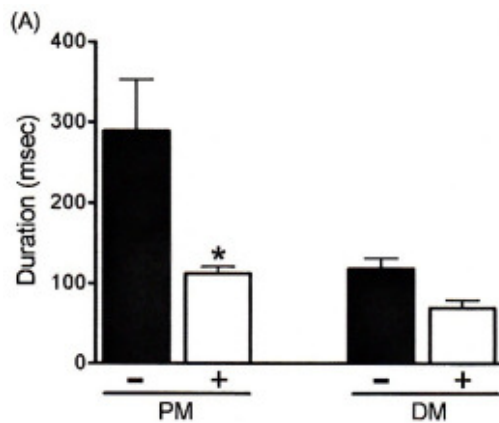
D.A. Meyer, J.M. Carter, A.F.M. Johnstone, T.J. Shafer: Pyrethroid modulation of spontaneous neuronal excitability and neurotransmission in hippocampal neurons in culture. *NeuroToxicology* 29 (2008), 213-225

# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen: Pyrethroid-Effekte auf Spike- und Burst-Raten

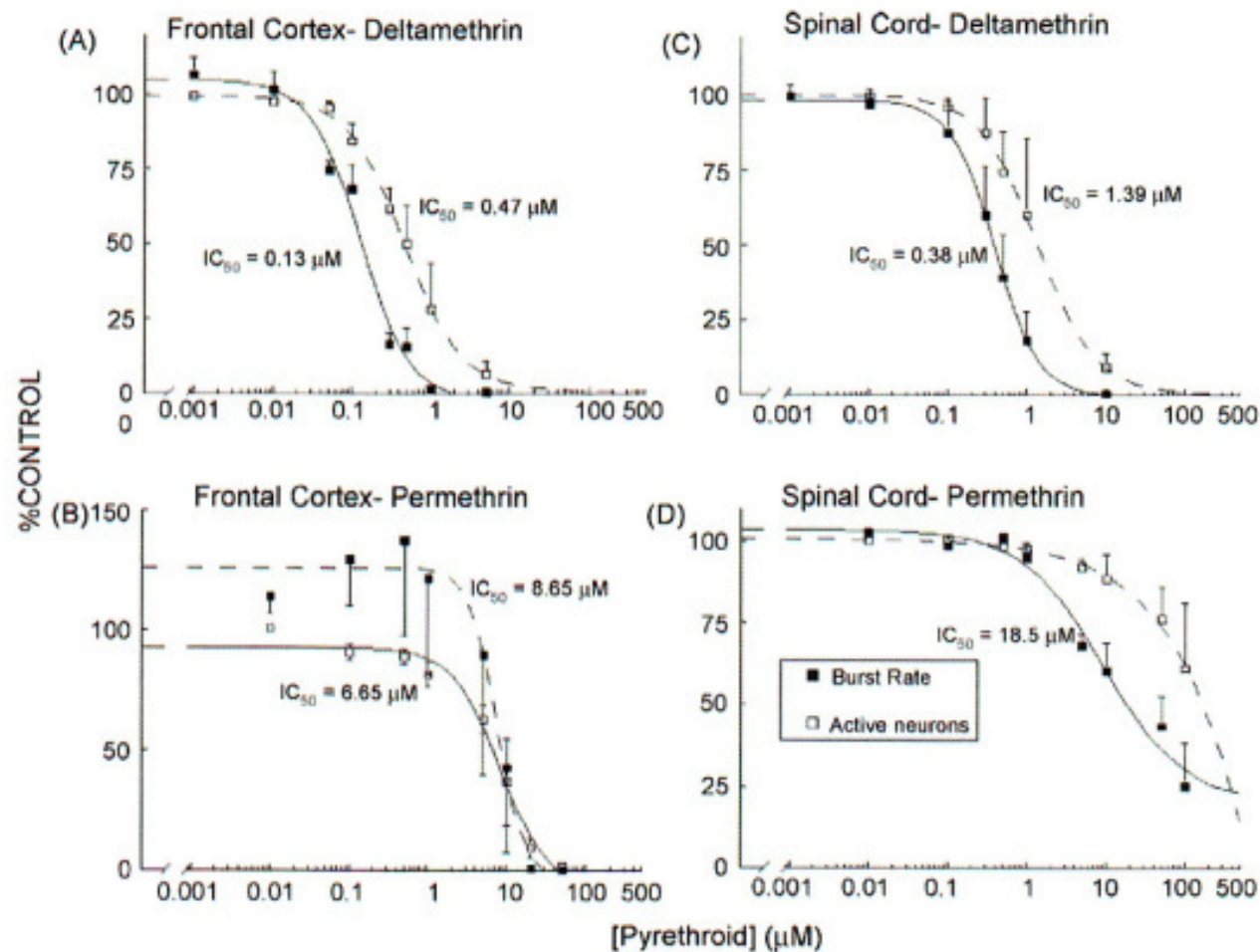


T.J. Shafer, S.O. Rijal, G.W. Gross: Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. *NeuroToxicology* 29 (2008), 203-212

D.A. Meyer, J.M. Carter, A.F.M. Johnstone, T.J. Shafer: Pyrethroid modulation of spontaneous neuronal excitability and neurotransmission in hippocampal neurons in culture. *NeuroToxicology* 29 (2008), 213-225



# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen: Pyrethroid-Effekte auf verschiedene neuronale Subtypen

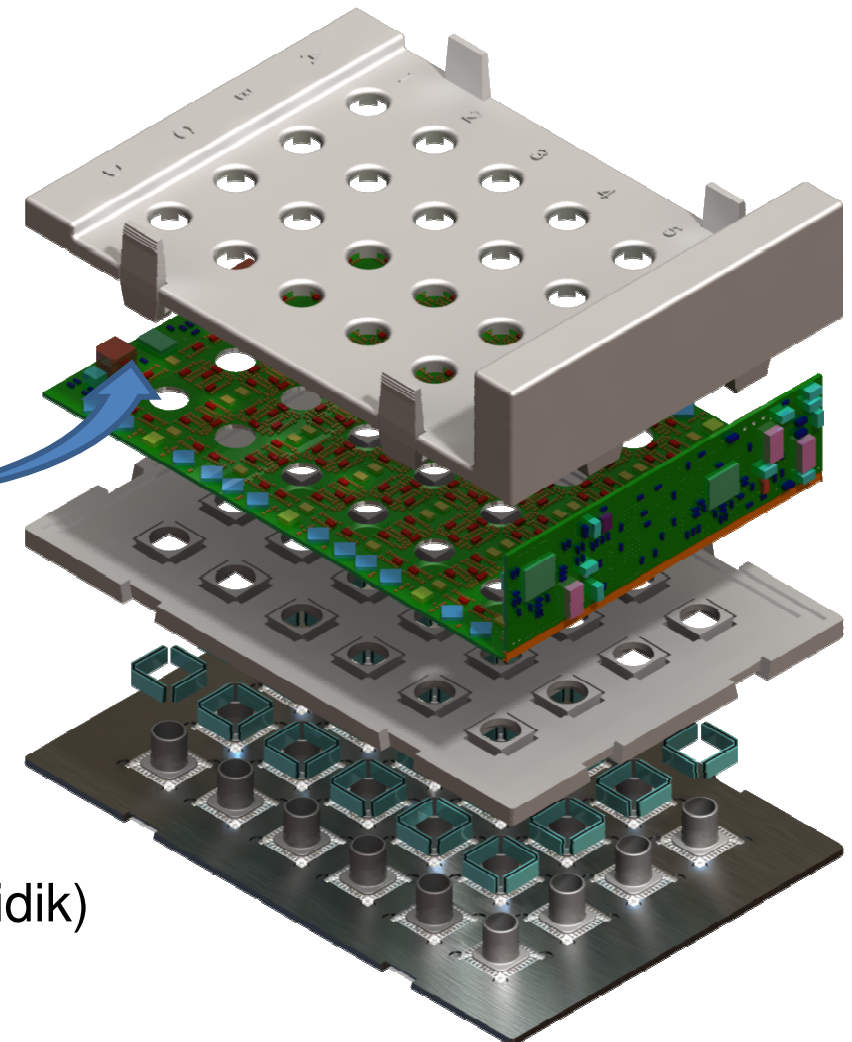
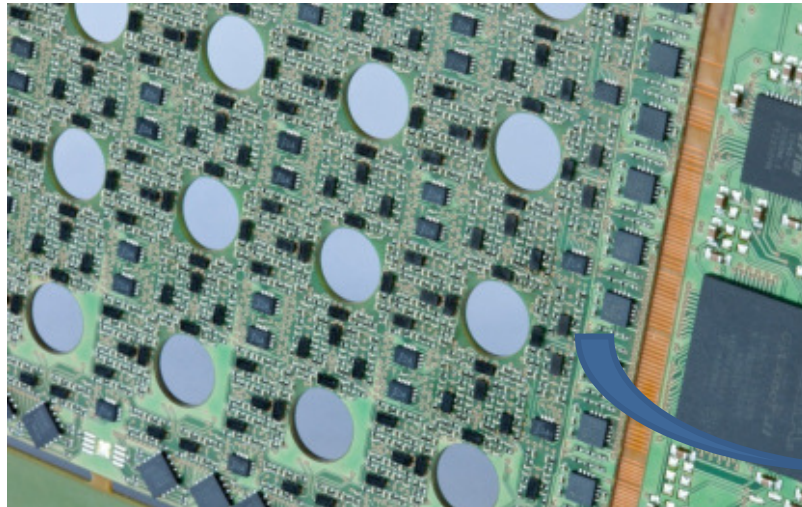


T.J. Shafer, S.O. Rijal, G.W. Gross: Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. *NeuroToxicology* 29 (2008), 203-212

D.A. Meyer, J.M. Carter, A.F.M. Johnstone, T.J. Shafer: Pyrethroid modulation of spontaneous neuronal excitability and neurotransmission in hippocampal neurons in culture. *NeuroToxicology* 29 (2008), 213-225



# Multielektroden Arrays (MEAs) für extrazell. Potentialableitungen



Für Screening-Anwendungen:

- Durchsatz-Steigerung und Kosten-Senkung
- MEA-Multiwellplatten
- Einbindung in automatisierte Plattformen (Fluidik)

## Gesamt-Bewertung

- Konzentrationen im relevanten Bereich? Effektive Konzentrationen = Rechnerisch ermittelte Konzentrationen? (Bindung an Oberflächen, Serum-Proteine)
- Persönliche Einschätzung: Ungeeignet außerhalb des Labors (Proben-Aufbereitung, sterile Zellkultur-Bedingungen)
- Fortschritte bei Stammzellen? (insbes. wichtig für MEA-Assays, neuronale Stammzellen)
- Standardisierung und Zertifizierung von Assays?

# Acknowledgements

Prof. Dr. Bernhard Wolf  
Franz Demmel  
Florian Ilchmann  
Robin Weiß

supported by:



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



Heinz Nixdorf Stiftung