

Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen

set



Projekt

Optimierung der Kryokonservierung primärer humaner
Hepatozyten für pharmakologische und toxikologische
Untersuchungen

Dr. Gesine Pless-Petig & Prof. Dr. Ursula Rauen, Universität Duisburg-Essen

08/2012 – 07/2014



3R reduce
refine
replace

Mainzer Landstraße 55
60329 Frankfurt/Main
Telefon 069-2556-1226
www.stiftung-set.de
info@stiftung-set.de

www.stiftung-set.de

Optimierung der Kryokonservierung primärer humaner Hepatozyten für pharmakologische und toxikologische Untersuchungen

Viele Toxizitäts- und Metabolisierungsstudien von Fremdstoffen können mittlerweile statt im Tierversuch in Zellkultur durchgeführt werden. Als wichtigstes Modell dienen hierbei – meist adhärenz – Kulturen primärer Hepatozyten, da diese Zellen die entscheidende Rolle im Fremdstoffmetabolismus spielen. Eine Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme kann im Allgemeinen zuverlässig bereits in der Zellkultur nachgewiesen werden, so dass entsprechende Substanzen gar nicht in den Tierversuch kommen.

Primäre humane Hepatozyten werden zum Beispiel aus tumorfreiem Randgewebe gewonnen, welches bei der chirurgischen Entfernung von Lebertumoren anfällt. Daher sind nur sporadisch Zellen verfügbar. Auf der anderen Seite können aus einem Stück Lebergewebe bis zu mehrere hundert Millionen Zellen auf einmal gewonnen werden – mehr, als in den meisten Fällen akut im Versuch eingesetzt werden können. Eine lang- oder mittelfristige Lagerung der Zellen ohne Funktionsverlust ist daher notwendig, um die Verfügbarkeit der Zellen zu gewährleisten.

Die Optionen zur Lagerung von Zellen und Gewebe beinhalten die Lagerung bei Temperaturen um 4 °C und das Einfrieren. Während erstere Methode eine zeitlich begrenzte Lagerung ermöglicht, können kryokonservierte Zellen praktisch für unbegrenzte Zeit gelagert werden. Kritische Prozesse sind dabei das Einfrieren und das Auftauen, nicht jedoch die Lagerung selbst. Eine erfolgreiche Kryokonservierung eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit, gefrorene Zellen ohne Qualitätsverlust an andere Zentren zu verschicken, was eine breitere Nutzung der Zellen ermöglicht.

Allerdings ist die Kryokonservierung von Hepatozyten problematisch (Abb. 1). Die Zellen reagieren empfindlich auf den Einfrier-/Auftauprozess und verlieren darüber hinaus ihre Fähigkeit, sich nach dem Auftauen an einer Zellkulturoberfläche anzuheften, was sie für die normale Zellkultur unbrauchbar macht.

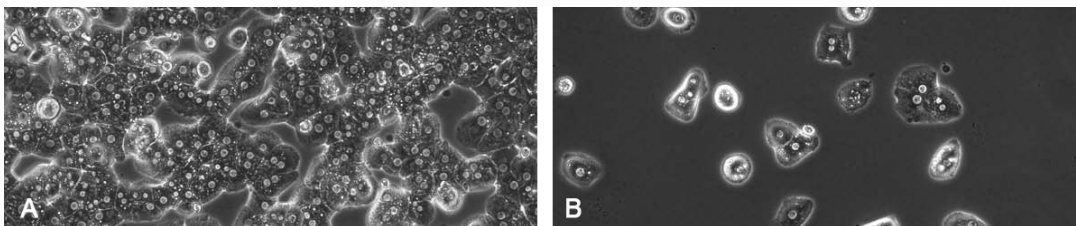


Abb. 1: Adhärenz Zellkultur von frisch isolierten Rattenhepatozyten 24 Stunden nach dem Aussäen (A) und von Rattenhepatozyten nach Einfrieren in Zellkulturmedium mit 10 % DMSO, Auftauen und 24 Stunden Kultur (B) bei gleicher Ausgangszellzahl. Nicht adhärenz Zellen wurden nach der Anheftphase abgewaschen.

Als Ursachen der Kryokonservierungsschädigung werden meist rein physikalische Phänomene (intrazelluläre Eiskristallbildung bei zu schnellem Einfrieren; Gefrieren des extrazellulären Wassers und daraus resultierender osmotischer Stress) diskutiert (Abb. 2). Neuere Befunde, u.a. aus unserer Arbeitsgruppe, zeigen jedoch, dass bei der Kryokonservierung verschiedener Zellen auch zelluläre Prozesse initiiert werden, die eine Anheftung der Zellen verhindern und/oder zu einem späteren Zelltod führen. Diese Prozesse scheinen durch Modifikation des Einfriermediums beeinflusst zu sein.

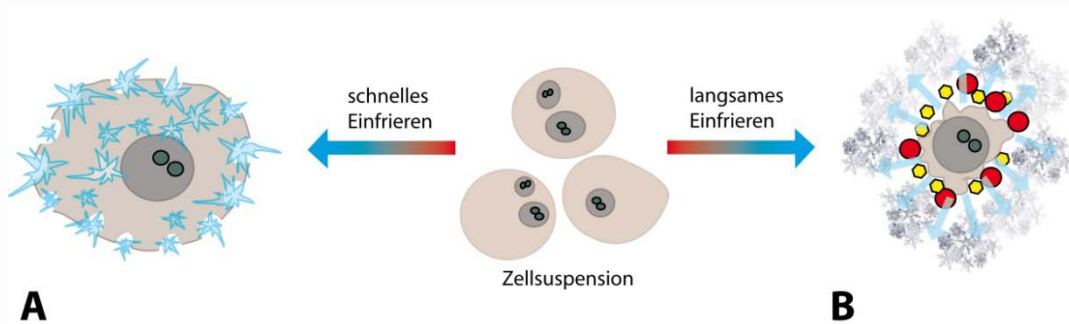


Abb. 2: Schädigung von Zellen bei der Kryokonservierung (nach P. Mazur, 1972). A: Durch schnelles Einfrieren bilden sich intrazelluläre Eiskristalle, die zu einer Schädigung der Zellmembran führen. B: Bei langsamem Einfrieren kristallisiert das extrazelluläre Wasser und die Konzentration extrazellulärer gelöster Stoffe nimmt zu, was osmotischen Stress zur Folge hat.

Ziel dieses Vorhabens ist es, basierend auf unseren Vorerfahrungen mit der Kaltlagerung (4° C) verschiedenster Zelltypen sowie der Kryokonservierung primärer Rattenhepatozyten und Schweineaortenendothelzellen, ein optimiertes Einfrier-/Auftauverfahren für primäre humane Hepatozyten zu entwickeln. Dadurch soll die Zellqualität nach dem Auftauen verbessert werden, so dass die kryokonservierten Zellen in pharmakologischen/toxikologischen Versuchen verwendet werden können.

Stand 02/2012

Projektleiterin



Prof. Dr. Ursula Rauen

Studium Humanmedizin in Düsseldorf und Aberdeen, Schottland, 1984-1991. Ärztin im Praktikum in Tübingen, Promotion zum Dr. med. 1993 in Düsseldorf. Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologische Chemie, Uni-Klinikum Essen 1993-2008. Habilitation für das Fach Physiologische Chemie 2000. Seit 2008 Professorin (W2) für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen. Forschungsgebiete: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung durch Kälte und Konservierungsschädigung von Transplantaten, Entwicklung von Protektionsmaßnahmen.

Mitarbeiterin



Dr. Gesine Pless-Petig

Studium der Biologie an der RWTH Aachen 1994-2000 (Diplom). 2000-2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin der AG Experimentelle Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité, Berlin. 2007 Promotion zum Dr. rer. medic.: „Nutzung nicht transplantabler humaner Spenderlebern als Zellquelle für extrakorporale Leberunterstützungssysteme“. Seit 2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin der AG Rauen, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen, Forschung zum Thema Kalllagerung und Kryokonservierung von Hepatozyten.

Ausführende Institution

Universitätsklinikum Essen
Institut für Physiologische Chemie
Hufelandstr. 55
45122 Essen

Förderungslaufzeit

01.08.2012 - 31.07.2014