

Die Perfusionszellkultur

Für eine Einschätzung der Wirkung von Naturstoffen auf den Zellstoffwechsel bedarf es eines sehr empfindlichen Testsystems, das es gestattet, bereits geringfügige Wirkungen in einem detaillierten zeitlichen Kontext zu erkennen. Die Ursache der positiven Wirkung Ihres Präparates auf den Organismus können kleinste Wirkungen auf Zellebene sein.

Dafür ist es notwendig, die Zellen über längere Zeiträume in einem quasi-stationären stabilen Zustand zu halten, d.h. unter Bedingungen, die der Situation im intakten Gewebeverband *in vivo* deutlich stärker angenähert sind als das in der konventionellen stationären Kultur möglich ist. Die von uns eingesetzte Perfusionszellkultur bietet diese Möglichkeit.

Wir führen die Wirkstoffuntersuchung mit einem speziellen zellulären Testsystem, der Perfusionszellkultur durch. Die Zellen (humane FL-Zelllinie) können in dieser besonderen Anordnung über ihre gesamte Lebensdauer (bis zu 10 Tage) unter organtypischen Bedingungen gehalten werden: Es wird ständig Nährmedium (DMEM = Dulbeccos Modified Eagles Medium) zu- und abgeführt, so dass die Zellen über die Gesamte Versuchsdauer mit frischem Medium versorgt werden und die Stoffwechselprodukte abgeführt werden.

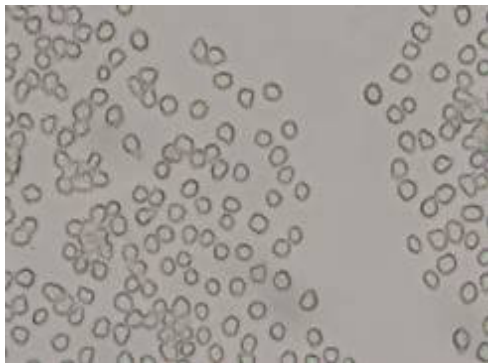


Abb. 1: FL-Zellen

Unter Bedingungen, wie sie in permanenten Zelllinien vorherrschen, erfolgt die Energiegewinnung teilweise durch Glykolyse. In einer statischen Kultur kann der Sauerstoff nur durch Diffusion zu den Zellen gelangen. Innerhalb kürzester Zeit ist deshalb der gelöste Sauerstoff durch die Zellen aufgebraucht. Die Zellen müssen auf die im Vergleich zur Zellatmung „ineffizientere“ Glykolyse zurückgreifen. Daher ist die Übertragung von Erkenntnissen aus statischen Zellkulturen problematisch: Die Energiegewinnung bei eukaryotischen Zellen *in vivo* erfolgt hauptsächlich über die im Vergleich zur Glykolyse wesentlich effektivere Zellatmung.

Die Verhältnisse in der dynamischen Perfusionszellkultur unterscheiden sich hingegen grundsätzlich von der Situation in einer statischen Kultur und sind den *in vivo* herrschenden Bedingungen wesentlich besser angepasst. Zum einen werden zelluläre Abfallprodukte ständig abtransportiert, zum anderen wird die Sauerstoffversorgung durch den ständigen Austausch des Kulturmediums drastisch verbessert. Der Energiestoffwechsel der Zellen kann sich in der Durchflusszellkultur also wieder auf die ausgiebige Nutzung der Atmung einstellen.



Abb. 2: Perfusionszellkammer und Zellträger, System der Minucells and Minutissue Vertriebs GmbH

Stoffwechselrelevante Parameter

In einer lebenden Zelle finden tausende biologische Reaktionen parallel statt, die zu einem komplexen Netzwerk zusammengekoppelt sind. Da die meisten Reaktionen Energie verbrauchen, sind Energie erzeugende (katabolische) Prozesse am stärksten gekoppelt. Katabolische Prozesse beginnen mit der Aufnahme von Nährstoffen (Glucose) und Sauerstoff und führen über den Abbau zu Zwischenprodukten zur Produktion von Energie und zur Ausscheidung von sauren Abfallprodukten. Der Glucoseverbrauch, die Lactatentstehung und die globale Ansäuerung sind daher sehr wichtige Größen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen.

Die Probenahme direkt hinter der Zellkammer ermöglicht die nicht invasive und zeitnahe Beobachtung der relevanten Stoffwechselfparameter in der Perfusionszellkultur. Genauso ist natürlich die Überwachung der Wirkstoffkonzentration möglich.

Glucoseverbrauch und Lactatentstehung

Glucose ist im Kulturmedium der Hauptenergielieferant für den Zellstoffwechsel. Den Zellen wird in der Perfusionszellkultur ein Überangebot von 0,16 mmol/h Glucose zur Verfügung gestellt. Der Glucoseverbrauch der Zellen stabilisiert sich nach einer Einlaufphase von etwa 1 Tag auf einen Wert von etwa 0,10 mmol/h um nach 8 Tagen langsam zu sinken und am Tag 12 zum Erliegen zu kommen.

Der Glucoseverbrauch unterliegt zwei Einflussgrößen:

Die Zellzahl kann als im Rahmen biologischer Streuung als konstant angesehen werden.

Maßgeblich für den Glucoseverbrauch ist die Aktivität des Zellstoffwechsels unter dem Einfluss von z. B.: Stoffwechsel stimulierenden Wirkstoffpräparaten. Hier ist im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein höherer Glucoseverbrauch in der stabilen Phase zu erwarten.

Da bei dem Glucoseabbau in der Zelle aus 1 mmol verbrauchter Glucose etwa 2 mmol Lactat gebildet werden ist die Lactatentstehung ebenfalls ein Maß für die metabolische Aktivität.

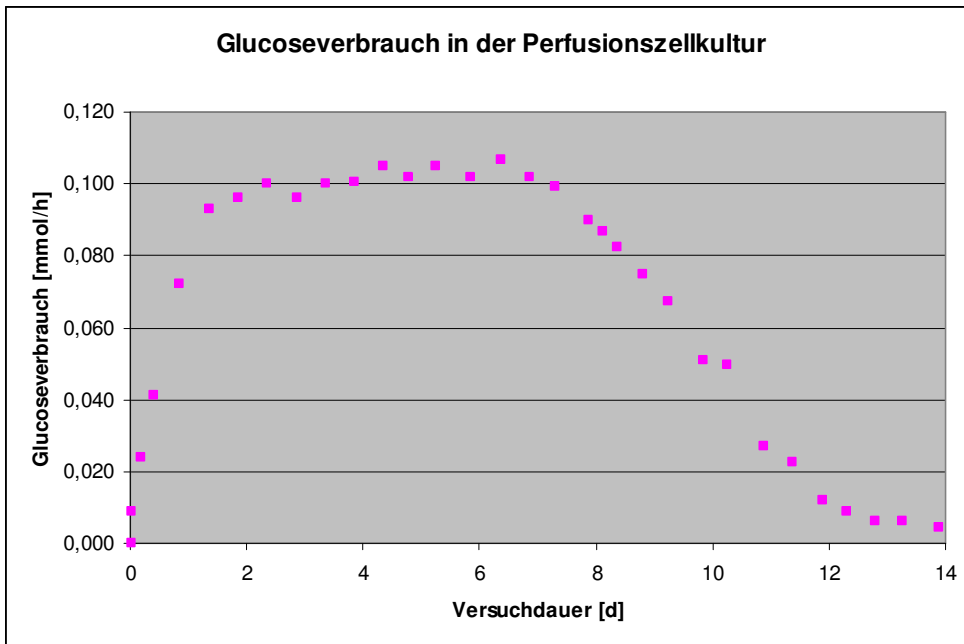


Abb. 3: Glucoseverbrauch in der Perfusionszellkultur ohne Einwirkung eines Wirkstoffpräparates. Stabile Phase: Tag 2 bis Tag 8.

pH-Wert-Änderung

Der pH-Wert im Nährmedium einer Perfusionszellkultur unterliegt generell zwei Einflussgrößen: Einerseits wird das Kulturmedium wegen des kontinuierlichen Entweichens von Kohlenstoffdioxid aus dem Medium in die Umgebung alkalisiert. Trotz Pufferung des Kulturmediums steigt der pH-Wert langsam an. Dieser Verlauf stellt eine bekannte Größe dar.

Andererseits wird das Kulturmedium durch den Zellstoffwechsel angesäuert. Dieser Effekt hängt von der Aktivität des Zellstoffwechsels ab.

Infolgedessen wird der pH-Wert durch den Zellstoffwechsel zunächst stabilisiert und steigt dann langsam an. Dieser Anstieg ist umso flacher, je aktiver der Zellstoffwechsel ausfällt. Demzufolge kann die Dauer der Stabilisierung des pH-Wertes und der anschließende Anstieg als Maß für die Stoffwechselaktivität gewertet werden.

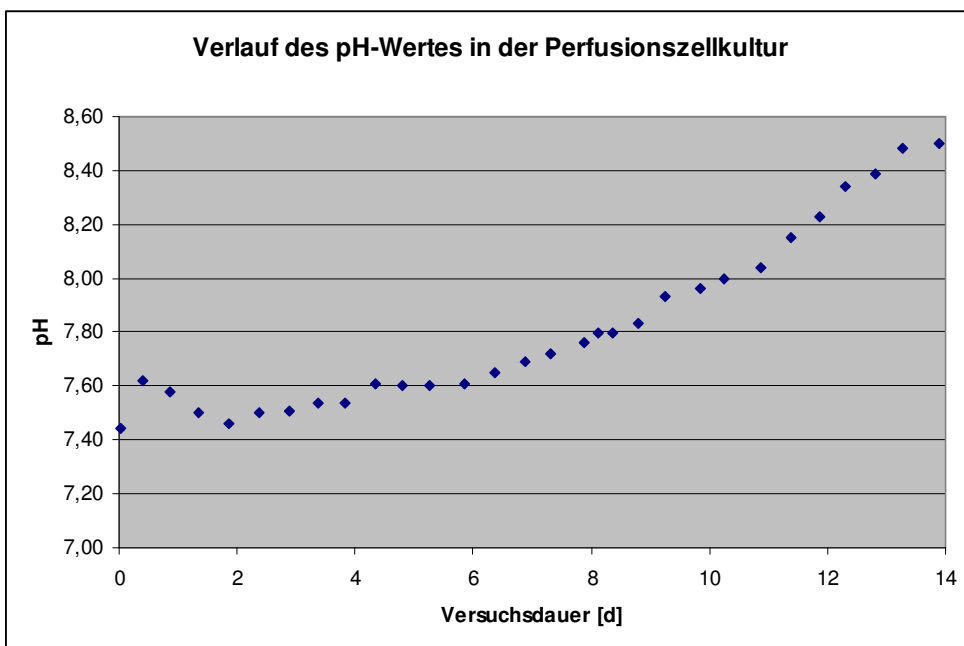


Abb. 4: Verlauf des pH-Wertes in der Perfusionszellkultur ohne Einwirkung eines Wirkstoffes. Stabilisierung des pH-Wertes durch Ansäuerung durch den Zellstoffwechsel bis zum Tag 6.

Es ist unter dem Aspekt des Nachweises einer Stoffwechsel stimulierenden Wirkung sinnvoll, den Metabolismus der Zellen während der ersten 8 Tage (vitale Phase) zu beobachten. Während dieser Zeit ist der Stoffwechsel der Zellen in der Perfusionszellkultur stabil und die stimulierende Wirkung lässt sich hier optimal beobachten.

Literatur (Auswahl)

Method for detection of subtoxic and chronic toxic substances using perfusion cell cultures. Juelich, W.- D.; Von Woedtke, Th.; Abel, P. U.;(1998),6 pp., DE 19709649 A1

The usefulness of a biosensor controlled perfusion cell culture for the investigation of new drugs demonstrated with the marine fungus *Kirschsteiniothelia maritima*. Von Woedtke, Th.; Lindequist, U.; Alhitari, N.; Kusnick, C.; Julich, W.-D.; Abel, P. U., Pharmazie, (2002), 57(4), 270-27

Biosensor-controlled perfusion culture to estimate the viability of cells. von Woedtke, T.; Jülich, W.-D.; Alhitari, N.; Hanschke, R.; Abel, P. U., Medical & biological engineering & computing (2002), 40(6), 704-11

Von der Zellkultur zum Tissue engineering. Minuth, W.W.; Strehl, R.;Schumacher, K., Pabst, Science Publishers, Lengerich, Berlin, Bremen, Riga, Rom, Viernheim, Wien, Zagreb 2002