

Der Einfluß der Zentrifugationstemperatur auf urologische Karzinom Zell Linien

T.Otto^{1,2,3,4}, T. Jäger^{1,2}, A. Wiggen-Kremer^{1,2}, J. Manig^{1,2}

1 Department of Urology, University of Essen Medical School, Essen, Germany

2 Department of experimental Urology, University of Essen Medical School, Essen, Germany

3 Nationales Genomforschungsprojekt (NGFN), Deutschland

4 Westdeutsches Tumorzentrum

In der Zellkultur gilt bislang eine Zentrifugation bei Raumtemperatur (21 °C) als Standardverfahren. Unter zellbiologischen Aspekten entspricht diese Temperatur jedoch häufig nicht den optimalen Kulturbedingungen. Insbesondere bei humanen Zell Linien kann sich eine Zentrifugation bei 37 °C, der Kerntemperatur des menschlichen Körpers, positiv auf die Vitalität der zentrifugierten Zellen auswirken und Zell Schädigungen vermindern. Aus diesem Grunde wird der Einfluss der Zentrifugationstemperatur auf die Vitalität der Zellen anhand verschiedener Linien urologischer Tumore untersucht.

Material und Methoden

Zell Linien

Die Untersuchungen werden an unterschiedlichen humanen Tumorarten, den Zell Linien T24, HTB44 und HTB J82, im folgenden auch Tumorentitäten genannt, durchgeführt.

Die humane kontinuierliche Zell-Linie T24 entspricht einem Papillom oder gut differenzierten Karzinom der Harnblase. Die Wuchsform dieser Zell-Linie entspricht einem Monolayer und die Morphologie der Zellen ist epithelial. Die HTB J82 Urothelzell-Linie entspricht einem Urothelkarzinom der Harnblase. Auch hier entspricht die Wuchsform einem Monolayer, die Zellmorphologie ist epithelial. Die humane Zell-Linie HTB 44



entspricht einem Karzinom der Niere. Die Wuchsform entspricht einem Monolayer, die Zellmorphologie ist epithelial. Die in vitro-Zytopathologie entspricht einem papillären Adenokarzinom der Niere. Die Zell Linien befinden sich vor der Zentrifugation im Stadium des subkonfluenten Wachstums.

Die Prüfung der Zellen auf Vitalität erfolgt mit der sogenannten Trypan-Blau Färbemethode. Diese Methode beruht auf der Durchlässigkeit des Farbstoffs durch die Zellmembran.

Gesunde, vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während geschädigte Zellen den Farbstoff aufnehmen und unter dem Mikroskop blau erscheinen. Die Vitalitätsuntersuchungen werden zur Bestimmung des Anteils vitaler und avitaler Zellen durchgeführt. Der Anteil an avitalen Zellen, also abgestorbenen Zellen, kann durch Belastungen, wie sie während der Zentrifugation auftreten, erhöht werden. Die für die Auswertung der Untersuchung notwendige Zellzählung erfolgt in der Neubauer-Kammer.

Zentrifugation

Die Zentrifugation der drei Zell Linien erfolgt zum einen bei der derzeitigen Standardtemperatur von 21 °C, zum anderen zur Ermittlung der Vergleichswerte bei 37 °C. Überprüft werden soll die Hypothese, dass Zentrifugation bei 37 °C zu signifikant weniger Zellschädigungen führt. Ermittelt wird dieses anhand des Quotienten aus avitalen: vitalen Zellen. Die Ergebnisse werden in Prozent avitaler Zellen angegeben.

Für das Zentrifugieren der Zellen wurden die folgenden Geräte und Methoden verwendet:

- Eppendorf Centrifuge 5702 RH, bei 1200 U / Min (dieses entspricht 220 x g), für 3 min bei 37 °C.
- Eppendorf Centrifuge 5702 R, bei 1200 U/min (220 x g), für 3 min bei Raumtemperatur (welche in diesem Falle 21 °C entspricht).

In beiden Zentrifugen wird der Ausschwingrotor Typ A-4-38 mit Adaptern für 50 ml konische Zentrifugengefäße eingesetzt.

Ergebnisse

In den Untersuchungen wurden für die drei Zell Linien T24, J82 und HTB44 eine um durchschnittlich 5 – 6 % erhöhte Anzahl avitaler Zellen nach der Zentrifugation bei Raumtemperatur gefunden. Die Zahl der durch Zentrifugation geschädigten oder traumatisierten Zellen verringert sich, wenn bei 37 °C, der menschlichen Kerntemperatur, zentrifugiert wird.

Die Einzelergebnisse für die Zell Linien stellen sich folgendermaßen dar:

Zell Linie T24

Die Zentrifugation bei Raumtemperatur erhöht den Anteil geschädigter Zellen um den Faktor 3,1, während Zentrifugation bei 37 °C den Anteil avitaler Zellen lediglich um den Faktor 2 erhöht. Der direkte Vergleich von Raumtemperatur (in diesem Falle 21 °C) gegenüber 37 °C führt zu dem folgenden Ergebnis: Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur ist der Anteil avitaler Zellen durchschnittlich 6 % höher als bei Zentrifugation bei 37 °C (siehe auch Tabelle 1).

Zell Linie HTB J82

Für die Zell-Linie HTB J82 wird unter 37 °C Bedingungen eine um durchschnittlich mehr als 5 % geringere Anzahl avitaler Zellen ermittelt. Im Vergleich zur Kultur vor Zentrifugation ist die Zahl durch Zentrifugation unter Raumtemperatur geschädigter Zellen um den Faktor 2.2 erhöht. Bei Zentrifugation unter 37 °C Bedingung ist der Faktor mit 1.7 signifikant niedriger (siehe auch Tabelle 2).

Zell Linie HTB44

Für die Nierenkarzinom Zell Linie HTB44 findet sich unter 37 °C Bedingungen eine 5 % niedrigere Anzahl avitaler Zellen. Im Vergleich zur Kultur vor Zentrifugation ist die Zahl durch Zentrifugation unter Raumtemperatur geschädigter Zellen um den Faktor 4.0 erhöht. Bei Zentrifugation unter 37 °C Bedingungen ist der Faktor mit 2.4 signifikant niedriger (Daten nicht gezeigt).

- **Table 1:** Ergebnisse der Zellzahlmessung an der gut differenzierten Harnblasenpapillom Zell Linie T24 vor und nach der Zentrifugation mit Angabe des prozentualen Anteils avitaler Zellen.

| Datum | Zell Linie: T24 | Prozentualer Anteil avitaler Zellen vor der Zentrifugation [%] | Prozentualer Anteil avitaler Zellen nach der Zentrifugation [%] | |
|--------------------|-----------------|--|---|-------|
| | | | RT | 37 °C |
| 14.01.2004 | T24 | 8 | 18 | 8 |
| 21.01.2004 | T24 | 2 | 12 | 6 |
| 28.01.2004 | T24 | 6 | 20 | 18 |
| Durchschnittswerte | T24 | 5,3 | 16,7 | 10,7 |

RT: Raumtemperatur, in diesem Falle 21 °C

● **Table 2:** Ergebnisse der Zellzahlmessung an schlecht differenzierter Harnblasenkarzinom Zell Linie J82 vor und nach der Zentrifugation mit Angabe des prozentualen Anteils avitaler Zellen.

| Datum | Zell Linie: T82 | Prozentualer Anteil avitaler Zellen vor der Zentrifugation [%] | Prozentualer Anteil avitaler Zellen nach der Zentrifugation [%] | |
|--------------------|-----------------|--|---|-------|
| | | | RT | 37 °C |
| | | | RT | 37 °C |
| 02.02.2004 | J82 | 6 | 12 | 10 |
| 16.02.2004 | J82 | 10 | 22 | 16 |
| 19.02.2004 | J82 | 18 | 38 | 34 |
| 24.02.2004 | J82 | 24 | 36 | 30 |
| 26.02.2004 | J82 | 8 | 24 | 16 |
| 02.03.2004 | J82 | 12 | 28 | 24 |
| 10.03.2004 | J82 | 4 | 16 | 14 |
| 16.03.2004 | J82 | 14 | 28 | 20 |
| 24.03.2004 | J82 | 6 | 18 | 10 |
| 31.03.2004 | J82 | 2 | 8 | 6 |
| 07.04.2004 | J82 | 10 | 20 | 14 |
| 14.04.2004 | J82 | 10 | 22 | 14 |
| Durchschnittswerte | J82 | 10,3 | 22,7 | 17,3 |

RT: Raumtemperatur, in diesem Falle 21 °C

Schlussfolgerung

Die Zentrifugation unter 37 °C Bedingungen ist schonender sowohl für die untersuchten Harnblasen- als auch Nierenkarzinom Zell Linien. Für die unterschiedlichen Zell Linien besteht somit ein gleicher Effekt, der auf andere Tumorentitäten übertragbar ist. Daher das Fazit für die Praxis: Die 37 °C Zentrifugation führt im Vergleich zur Standardzentrifugation zu signifikant weniger Zellschädigungen und ersetzt die bisherige Standardmethode. Die Methode der 37 °C Zentrifugation erscheint für eine Vielzahl zellbiologischer Experimente wertvoll, bzw. nicht verzichtbar.

Warum eine aktiv heizbare Zentrifuge?

Eppendorf bietet speziell für die temperaturgenaue Zentrifugation bei 4 °C und 37 °C die Centrifuge 5702 RH an. Bei dieser Zentrifuge handelt es sich um ein Gerät mit Kühl- und zusätzlichem, aktiven Heizsystem bis 42 °C, welches in dem für die Proben optimalen Bereich um 37 °C besonders genau temperieren kann. Ein aktives Heizsystem bedeutet, dass die Zentrifuge über die integrierte Heizung ohne Drehen des Rotors erwärmt werden kann. Die Centrifuge 5702 RH kann somit auch im sogenannten Standby Betrieb auf 37 °C betriebsbereit gehalten werden – während des ganzen Arbeitstages bis zu acht Stunden lang.

Die Centrifuge 5702 RH erfüllt die Vorschriften der IVD (In Vitro Diagnostika) Richtlinie. IVD geregelt sind Medizinprodukte, die zur In-vitro-Untersuchung von aus dem menschlichen Körper stammenden Proben Informationen liefern u.a. über physiologische oder pathologische Zustände oder Anomalien oder therapeutische Maßnahmen überwachen helfen (IVD-Richtlinie, Art. 1). Mit der IVD-Richtlinie und den dazugehörigen Normen (EN-Normen) ist ein einheitliches Qualitäts- und Sicherheitsniveau europaweit für diese Produkte festgelegt worden.

Bestellinformationen**International**

| Produkt | Bestell-Nr. |
|---|--------------------|
| Centrifuge 5702 RH, 230 V, 50 – 60 Hz, ohne Rotor | 5704 000. 016 |
| Ausschwingrotor A-4-38 inkl. 4 Rundbechern | 5702 720. 003 |
| 2 Adapter für 50 ml Falcon® | 5702 734. 004 |

USA and Canada

| Product | Order no. |
|---|------------------|
| Centrifuge 5702 RH, 120 V, 60 Hz, without rotor | 022626213 |
| Swing-bucket rotor A-4-38 incl. 4 round buckets | 022639048 |
| 2 adapters for 50 ml Falcon® | 022639226 |

eppendorf
In touch with life