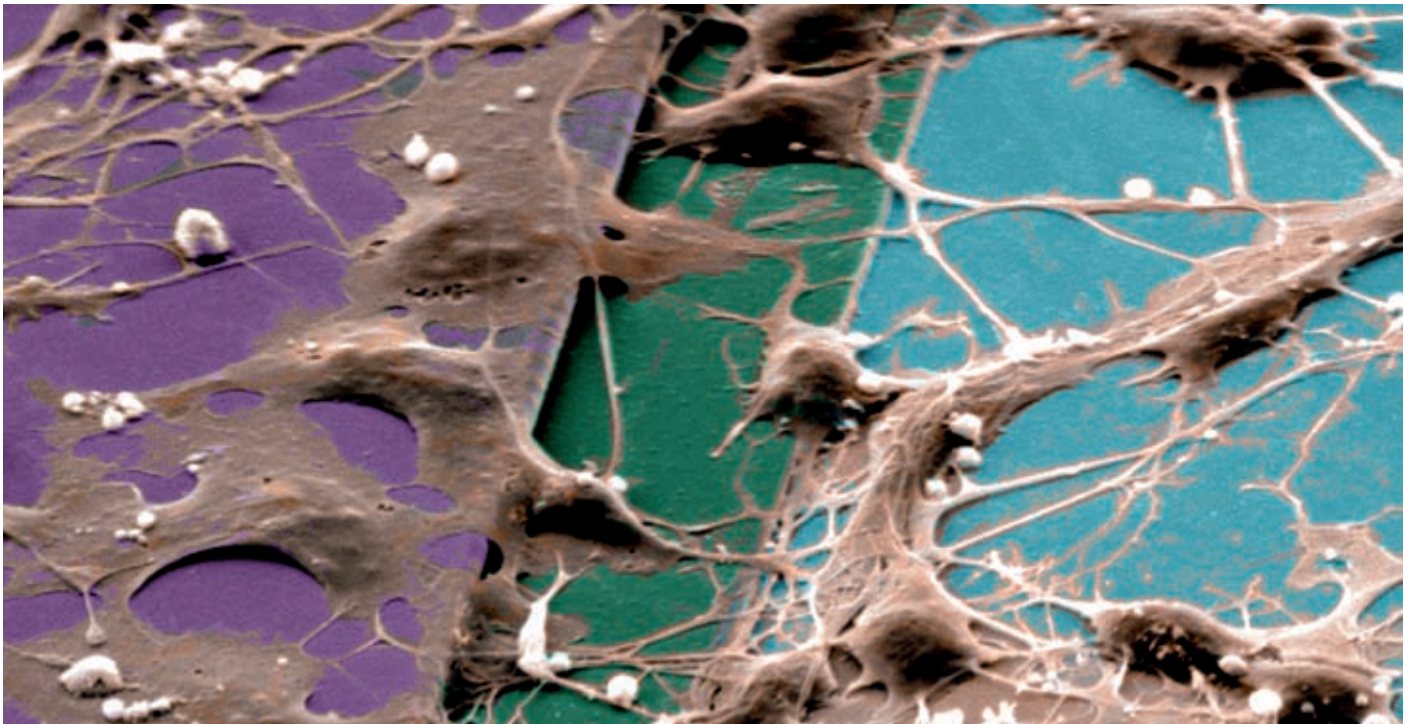


Fast wie *in vivo*:

Langzeit-Beobachtung von Zellen *in vitro*



Das Bionas 2500 analyzing system erlaubt durch sein einzigartiges Perfusionssystem erstmals eine Langzeit-Beobachtung von lebenden Zellen in Gegenwart von Wirkstoffkandidaten und damit auch die Untersuchung von Regenerationseffekten. Eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten in der Reaktionskammer wird durch das Perfusionssystem vermieden.

Das Bionas 2500 analyzing system ermöglicht eine kontinuierliche Beobachtung von lebenden Zellen bis zu mehreren Tagen zur pharmakodynamischen und zytotoxischen Untersuchung von Wirkstoffkandidaten. Bei der Technologie werden lebende Zellen auf Siliziumchips kultiviert, die Sensoren für metabolisch relevante Parameter, wie den Sauerstoffverbrauch von Testzellen, die extrazelluläre Ansäuerungsrate und die Zelladhäsion, enthalten. Die Chips werden bei Micronas (www.micronas.com) mit einem standardisierten Prozessverfahren hergestellt, wodurch eine reproduzierbare Produktqualität gewährleistet ist.

Die Technik ist leicht handhabbar und ermöglicht eine nicht-invasive, labelfreie und kontinuierliche Beobachtung des Zellstoffwechsels in Abhängigkeit von Testsubstanzen. Die Technologie ist bei

vielen verschiedenen Zelltypen und Zelllinien einschließlich Primär-Zellkulturen anwendbar. Auch Konzentrationsabhängigkeiten oder Regenerationseffekte können untersucht werden.

Bionas 2500 analyzing system

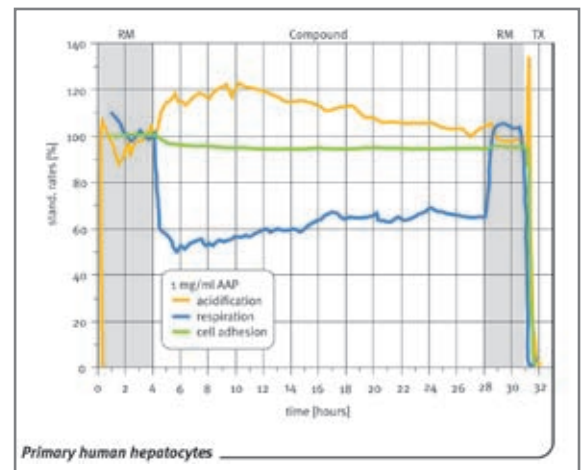
Die mit Zellen besiedelten Sensorchips werden zur Analyse des Zellstoffwechsels in das Bionas 2500 analyzing system eingelegt (Abb. 1). Es können sechs Sensorchips parallel ausgelesen werden. Das System verfügt über eine automatische Fluidik-Einheit, welche die Zellen in regelmäßigen, programmierbaren Abständen mit frischem Medium oder Medium mit Testsubstanz versorgt. Eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten in der Reaktionskammer wird durch das Perfusionssystem vermieden.

Die eigentliche Messkammer hat ein Volumen von 6 µl und ermöglicht daher eine sehr sensitive, dynamische Detektion von extrazellulären Änderungen. Der Messbetrieb erfolgt im Stopp & Go Modus. Das Gerät ist mit einer Steuer- und Auswertungssoftware ausgestattet, das die direkte Ansteuerung des Systems und des Au-

tosamplers ermöglicht und die erfassten Daten online visualisiert. Der Autosampler ermöglicht ein automatisiertes und unbeaufsichtigtes Abarbeiten der gesamten Mess-Sequenz.

Target Validierung

Das Bionas 2500 analyzing system wird von Solvay Pharmaceuticals bereits als wertvolle Methode für Target Validierungs-Studien anerkannt und genutzt. Insbesondere, dass die Targets in ihrem physiologischen Kontext untersucht werden können, wird von den Wissenschaftlern bei Solvay geschätzt.



Auch ein phänotypisches Screening mit Substanzen, deren Targets noch nicht bekannt sind, ist mit dieser Technologie möglich. Durch die Untersuchung der Auswirkung von Substanzen auf die Physiologie von Zellen können wertvolle Einblicke gewonnen werden, die zur Identifizierung neuer Wirkstoffe gegen Krebs, Stoffwechselkrankheiten oder Krankheiten die das Immunsystem betreffen, führen können. Tumorzellen, beispielsweise, können ein verändertes Glykolyse- und Anheftungs-Verhalten zeigen, so dass mit dem Bionas System gezielt nach Substanzen gesucht werden kann, die dieses abnormale Verhalten verstär-

“The Bionas system allows us to extend and optimize target validation studies by bringing the targets back into their physiological context.”

Dr. Eric Ronken, Principal Scientist at Solvay Pharmaceuticals.

ken oder inhibieren. Ähnliches ist für Substanzen denkbar, welche die Fettsäureoxidation (Adipositas) oder Glykolyse und Zellatmung (Diabetes) modulieren.

Analyse der GPCR Aktivität

Das Bionas System kann auch zur Analyse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) heran gezogen werden, indem mit Hilfe der IDEs Sensoren auf dem Chip die Impedanzänderung infolge ihrer Stimulierung gemessen wird. Veränderungen bei Zelladhärenz, -morphologie und -volumen beeinflussen den gemessenen extrazellulären und transzellular-

Abb. 1: Bionas 2500 analyzing system



lären Wechselstromwiderstand Strom. Jede dieser physiologischen Veränderungen kann durch Rezeptorstimulation hervorgerufen und mit unserem Gerät gemessen werden.

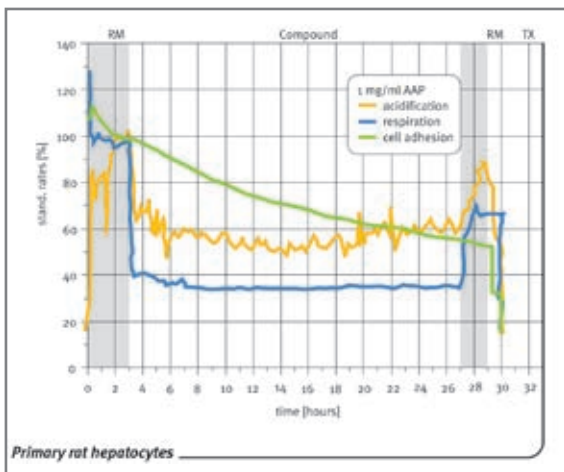
Auch die durch Apoptose induzierten morphologischen Veränderungen von Zellen (Schrumpfen, Auflösung etc.) können durch das Bionas System in hoher zeitlicher Auflösung erfasst werden.

Hepatotoxizität analysieren

Des weiteren ermöglicht Bionas 2500 Untersuchungen zur Hepatotoxizität von Wirkstoffkandidaten in Zelltypen wie HepG2 und humanen primären Hepatozyten. Der Vorteil der online-Beobachtung des zellulären Metabolismus wird beim Vergleich von primären humanen Hepatozyten und primären Rattenhepatozyten deutlich. Beide Primärzelllinien wurden in speziellem Zellkulturmedium auf kollagenbeschichteten Sensorchips kultiviert. Als Testsubstanz diente Paracetamol (Acetaminophen (AAP): IC50 19 mM), welches für seine Lebertoxizität bekannt ist. Nach 3–4 Stunden wurde Paracetamol hinzugefügt (Abb. 2).

Während bei den humanen Hepatozyten nur die Atmungsaktivität reduziert wird, zeigen die Rattenhepatozyten deutlich stärkere Effekte. Nicht nur die Atmungsrate ist schneller und stärker reduziert. Auch die Ansäuerungsrate ist bei den Rattenhepatozyten schon während der ersten 30 min Exposition mit Paracetamol deutlich inhibiert. Außerdem nimmt die Adhäsion der Zellen auf der Chipoberfläche langsam aber kontinuierlich ab.

Abb. 2: Primäre Hepatozyten aus Mensch (a) und Ratte (b) werden mit 1 mg/ml Paracetamol (Compound) inkubiert. Dargestellt sind die Ansäuerungsrate (gelb), Atmungsrate (blau) und Adhäsion (grün) der primären Hepatozyten. RM (Running Medium, Medium ohne Testsubstanz), Stand. Rates (standardisierte Raten), TX (0,2% Triton X-100 in RM) zum Abtöten der Zellen und als Test, dass die aufgenommenen Daten valide sind.



Zur Untersuchung der Regeneration wurde danach statt Medium (+) Paracetamol nur Medium über die Zellen geleitet (ab ca. 27 h, graues Feld). Während die humanen Hepatozyten vollständige Regeneration zeigen, erreicht die Ansäuerungsrate der Rattenzellen nur 85% und die Sauerstoffrate nur 70% der ursprünglichen Aktivität. Die Adhäsion zeigt keinerlei Regenerierung, was auf eine dauerhafte Schädigung der Zellen hinweist.

Die kontinuierliche Beobachtung der Zellen zeigt den sequenziellen Einfluss von Paracetamol auf den Zellenmetabolismus, der bei einer Endpunkt-Methode nicht erfasst worden wäre. Während die humanen Zellen noch für weiteren Test verwendet werden könnten haben die Rattenhepatozyten durch Paracetamol irreversibel Schaden genommen.

Lead Optimierung

Bionas 2500 analyzing system kann auch zur Optimierung von Leitstrukturen herangezogen werden, die in einem Screening identifiziert worden sind. Denn die sukzessive Optimierung dieser sogenannten “Leads” mittels medizinische Chemie erfordert eine ständige Kontrolle in Testzellen, um eine etwaige Toxizität möglichst früh zu erkennen.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. Dieter Runge, Primacyt GmbH, für die Primärzellen und ihre Kultivierung auf den Sensorchips sowie Dr. Sabine Duntze, b3c communications, für ihre Unterstützung bei der Fachkommunikation.

Autoren:

Dr. Elke Theding, Dr. Ralf Ehret, Dr. Michael Schulze, Bionas GmbH

Kontakt:

Dr. Michael Schulze
Head of Sales & Marketing
Bionas GmbH
Rostock-Warnemünde
Tel.: 0381/5196-241
michael.schulze@bionas.de
www.bionas.de