

# Das Zauberwort heißt "Minusheet"

## Epithelzellen brauchen "natürliche" Wachstumsbedingungen

Als Alternative zum Tierexperiment können heute viele Teilfunktionen von Organen mit Zellkulturen untersucht werden - vorausgesetzt, diese Kulturen wachsen unter möglichst natürlichen Bedingungen und weisen einen entsprechend hohen Differenzierungsgrad auf. In dieser Hinsicht sind insbesondere Primärkulturen von Epithelien besonders anspruchsvoll. Sie gedeihen in den herkömmlichen Plastikschalen mit gelegentlichem Mediumwechsel eher schlecht als recht. Ein Regensburger Anatomieprofessor sann auf Abhilfe und brachte vor zwei Jahren die "Minusheets" auf den Markt: einfach konstruierte Scheibchen, auf denen Epithelien außerordentlich gut wachsen.

Eigentlich besteht ein "Minusheet" von Prof. Will Minuth nur aus einem flachen Scheibchen mit einer konzentrischen Halterung, in die ganz individuell Trägermaterial zur optimalen Differenzierung für die Zellen eingespannt werden kann. Mit einem Durchmesser von 13 mm passen die kleinen Scheiben in gängige Kulturschalen und bieten den auf ihnen ausgesäten Zellen zunächst einen verbesserten Kulturschalenboden. Die wiederverwendbaren Minusheets eignen sich aber auch für Perfusionskulturen (Abb.3), bei denen das Medium die Zellkultur permanent durchströmt und Stoffwechselprodukte kontinuierlich abgeführt werden. Außerdem können in einer Gradientenperfusionskammer die wachsenden Zellen von beiden Seiten mit ganz unterschiedlichen Medien versorgt werden, wobei der für die Niere charakteristische luminale und basale Salz- und Flüssigkeitsgradient simuliert werden kann. Über die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Minusheets ist mehrfach ausführlich berichtet worden (s. Literaturhinweise). Hier sollen erste Ergebnisse vorgestellt werden, die mit Hilfe der Minusheet-Technik an Nierenzellen gewonnen wurden (Minuth et al.;1992).

Nierenepithelien wachsen häufig weder auf impermeablen noch auf semipermeablen Böden von

Gewebekulturschalen oder Filtern in befriedigender Dichte und Zelldifferenzierung. Sie entdifferenzieren zudem schnell und eignen sich dann nicht mehr für weitergehende Untersuchungen. W. Minuth legte zunächst eine Vorkultur der renalen Zellen an. Auch dafür eignen sich die Minusheets: Dünne Capsula-fibrosa-Häutchen der Niere von neugeborenen New Zealand-Kaninchen werden in die Minusheet-Halterung eingelegt und in 24-well Gewebekulturplatten kultiviert. Binnen 24 Stunden bildet sich ein einschichtiges und polar differenziertes Sammelrohrepithel aus. Jeweils sechs dieser

"zellhaltigen" Minusheets kommen jetzt in eine Perfusionskammer und werden kontinuierlich über 13 Tage mit einem geeigneten Medium perfundiert.

Neben einem antibiotikahaltigen Kontrollmedium wurden Aldosteron-, Vasopressin- bzw. Insulin-haltige Medien getestet. 14 Tage nach Ansetzen der Kultur wurden die Zellen fixiert und histologisch untersucht. Bei Epithelzellkulturen, die mit hormonfreiem Medium versorgt worden waren, bildete sich nur ein einziger Zelltyp aus -ähnlich wie bei konventionell gezüchteten Zellen. Mindestens zwei Zelltypen konnten dagegen identifiziert werden, wenn das Medium einen Hormonzusatz enthielt. Besonders die Zugabe von Aldosteron förderte die Differenzierung in helle "principal cells" und dunkle "intercalated cells" - beide Zelltypen finden sich auch im Sammelrohr von Nieren. Auch morphologisch glich das Nierenepithel mit seinen kubisch geformten Zellen ganz der In-vivo-Situation. Wurden drei Hormone - wie z.B.

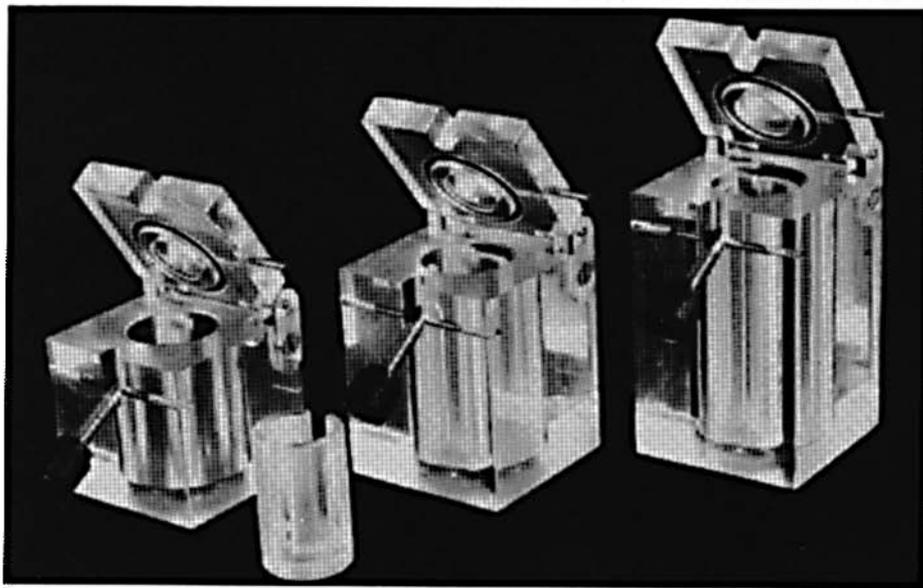


Abb. 3: Perfusionskammern für Minusheets in unterschiedlichen Größen

Aldosteron, Vasopressin und Insulin - dem Medium zugegeben, betrug der Anteil der dunkel gefärbten Zellen 90%. Sie konnten nach spezieller Anfärbung als  $\beta$ -Zelltyp der "intercalated cells" identifiziert werden. Unter dem Elektronenmikroskop ließen sich ihre charakteristische Struktur und die typische Konzentration von vielen Mitochondrien im apikalen Zellbereich erkennen. Unter konventionellen Bedingungen war es bisher nicht gelungen, aus embryonalen Epithelien der renalen Sammelrohrampulle Zellen mit vergleichbar hohem Differenzierungsgrad zu züchten

### Zellkulturen "on line"

In einem neu entwickelten "Perfusions-Bioreaktor" können Veränderungen an den Zellen elektronisch registriert und mit dem Computer ausgewertet werden. Die Zellen müssen zwar nach wie vor gehegt und gepflegt werden, aber auch das wird zunehmend einfacher. Medienz- und -abfuhr übernimmt der Bioreaktor, der gleich mehrere Perfusionskammern aufnehmen kann. Exakte, reproduzierbare parallele Testreihen mit geringem Arbeitsaufwand sind das Ergebnis. Umweltfreundlich ist das Ganze auch, denn alle Teile sind wiederverwendbar. Deshalb gibt es auch keinen Grund zur Klage mehr für W. Minuth's Musterzelle Max, die sich einst über schlechte Kulturbedingungen beschwerte, denn: Max mag Minusheet.

bg

Die Arbeiten von W. Minuth wurden mit dem Philip Morris Forschungspreis 1992 ausgezeichnet.

#### Literaturhinweise:

Minuth WW: Kultivierung differenzierter Zellen unter natürlichen Bedingungen. *Bio Engineering* 1991;5:66-69

Minuth WW: MINUSHEET - eine Kulturmethode für anhaftende Zellen unter "natürlichen" Bedingungen. *ALTEX* 1991;15:18-30

Minuth WW, Dermietzel R, Kloth S, Hennerkes B: A new method culturing renal cells under permanent superfusion and producing a luminal-basal gradient. *Kidney Int* 1992;41:215-219

Minuth WW, Stöckel G, Kloth S., Dermietzel R: Construction of an apparatus for cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions. *Eur J Cell Biol* 1992;57:132-137

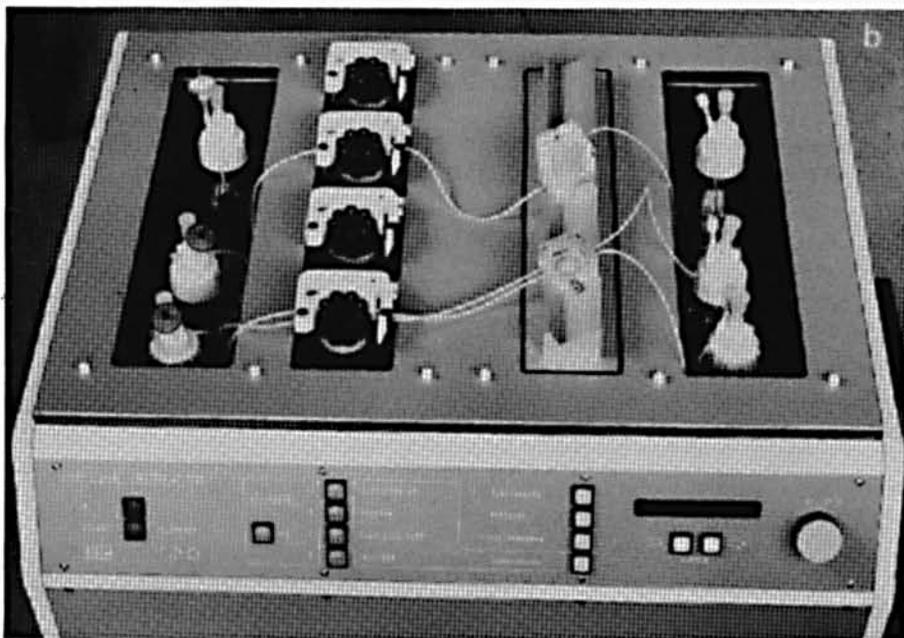


Abb. 4: Neu entwickelter "Perfusions - Bioreaktor"

## FORUM • FORUM • FORUM • FORUM • FOR

Der Schweizer Philosoph Beat Sitter-Liver, Generalsekretär der schweizerischen Akademie der Geistes- und Sozialwissenschaften sowie Dozent an der Universität Freiburg (Schweiz), hielt im Juni 1992 an der Universität Hannover einen Vortrag, der die Rechtsstellung von Tieren zum Thema hatte. Vor dem Hintergrund der derzeitigen Erwägungen, den Tierschutz im Grundgesetz zu berücksichtigen, wurde B. Sitter-Liver's Plädoyer für Tier-Rechte heftig diskutiert. Der Redner stellte "In-vitro-Systeme" eine gekürzte Fassung seines Vortrages zur Verfügung:

## Tierrechte und ihre Grenzen

Ob wir Tieren gegenüber direkt verpflichtet sind, ist so kontrovers wie die Frage, ob Tiere Rechte besitzen können. Dies nicht zuletzt darum, weil die Bejahung einer oder beider Fragen manche heute gängige Form der Nutzung von Tieren in Zweifel zöge. Dennoch gibt es - positiv-rechtlich bereits abgesicherte - Bestrebungen, Tiere als Objekte der Moral mit eigenem rechtlichem Schutz auszustatten, ihnen Würde zuzugestehen. In dieser Situation soll zwar für Tierrechte argumentiert werden, nicht jedoch ohne deren Grenzen nachzuziehen.

Tiere besitzen einen Eigenwert, ganz unabhängig davon, ob sie irgendeinem anderen Lebewesen, etwa dem Menschen, nützen. Ihnen kommt deshalb ein moralischer Status zu, der Achtung erfordert und Anlaß zur

Verankerung von positiven Rechten für Tiere in der Gesetzgebung geben kann.

Gegen Tierrechte werden auch Einwände erhoben. Näher besehen, verfangen sie nicht. Man muß nämlich nicht natürliche Person sein, um Rechte besitzen zu können (man denke an Vermögensmassen oder Aktiengesellschaften). Schwierigkeiten in der Anwendung (wenn sie überhaupt bestehen) bilden keinen ethisch befriedigenden Grund, jemandem Rechte zu verweigern. Im übrigen gelten Rechte nie absolut, weder Menschen- noch Tierrechte; Rechte- wie Pflichtenkonflikte stehen der Vermittlung also offen. Ferner ist Rechtsfähigkeit nicht an die Voraussetzung gebunden, daß