

Schlüsselwörter: Kryokonservierung · Kryoröhrchen · Tissue Engineering · automatisches Einfriergerät

Das Einfrieren biologischer Materialien in der Medizin/Biologie beschränkt sich derzeit im Wesentlichen auf Zellsuspensionen verschiedenen Ursprungs (Blut, Stammzellen etc.) und wird in der Regel erfolgreich in einem automatischen Einfriergerät nach einem zellspezifischen Protokoll durchgeführt. Die Kryokonservierung von artifiziellen Geweben für die Regenerative Medizin stellt jedoch verschärfte Anforderungen an Technik und Verfahren. Ein Aspekt dabei ist die Sicherung der Homogenität der Temperaturverteilung in einem solchen Freezer. Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass die zur Zeit erhältlichen Einfriergeräte wenig geeignet sind, um natürliche und *in vitro* hergestellte Gewebe für Gewebebanken zuverlässig einfrieren zu können.

Temperature profiles within a freezer for medicine/biology

Keywords: Cryopreservation · Cryovials · Tissue Engineering · programmable freezer

Freezing of biological materials in medicine and biology is mainly limited to cell suspensions of different origin (blood, stem cells etc.). Normally the cryopreservation is carried out in an automatic freezing unit following a cell specific protocol. But the cryopreservation of artificial tissue for regenerative medicine requires a higher homogeneity of the temperature distribution within such a freezing unit for a successful preservation process. The presented investigations show the lack of this homogeneous temperature distribution in the actually available commercial freezers. Improvements are proposed.

Autoren



Dr. rer. nat. Gabriele Spörl,



Dipl.-Ing. Holger Reinsch,
Institut für Luft- und Kälte-
technik ILK, Dresden

Temperaturprofile in einem Einfriergerät für Medizin/Biologie

Einleitung

Das Einfrieren biologischer Materialien gewinnt im Bereich der Medizin und Biologie zunehmend an Bedeutung. Derzeit gehört die Kryokonservierung von Zellen für Diagnostik und Forschung weltweit zum Standard vieler biologischer und medizinischer Forschungseinrichtungen (Referenzzellen, Lagerhaltung von Zelltypen für die Forschung und Produktentwicklung, Anlegen von Depots von genetischem Material, Blutkonserven etc.). Die klinischen Anwendungen kryokonservierter Zellen sind vorwiegend auf die patientenorientierte Tieftemperaturkonservierung von autologem Blut sowie Gewebe- und Stammzellen, Spermata etc. ausgerichtet. Die Kryokonservierung von Blutbestandteilen zur allogenen Anwendung ist auf einige transfusionsmedizinische Zentren beschränkt. Dies bedeutet, dass bislang fast ausschließlich Zellsuspensionen kryokonserviert werden. In den meisten Fällen werden dazu Kryoröhrchen benutzt und die Konservierung erfolgt durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff. Insbesondere bei großen Mengen an Gefriergut und bei der Kryokonservierung von Vollblut, Blutzell- und Plasmaprodukten, welche in Spezialbeuteln konserviert und gelagert werden, kommen automatische Einfriergeräte (Freezer) zur Anwendung, in denen nach einem vorgegebenen Protokoll (Kryoprotokoll) konserviert werden kann. Derartige Kryoprotokolle geben Auskunft über die zu verwendenden Einfriermedien (Kryoprotektiva), die Art und Weise der Einbringung und Entfernung selbiger, den Temperaturverlauf während der Abkühlung und Erwärmung sowie benötigte Hilfsmittel. Suspendierte Einzelzellen (und als Spezialfall Blut) tolerieren augenscheinlich eine Kryokonservierung in marktüblichen Einfriergeräten recht gut. Zur Kontrolle des Einfrierprozesses dienen die in diesen Freezern eingesetzten, vergleichsweise großen (Durchmesser ca. 1,5 ... 2 mm, Länge ca. 10 ... 15 mm) Temperatursensoren (Platinwiderstand Pt 100). Sie scheinen den Einfrierprozess von Suspensionen dennoch recht gut abzubilden. Mit Blick auf den Aufbau von Gewebebanken für die Regenerative Medizin wird die

Kryokonservierung von Tissue Engineering (TE) Konstrukten (*in vitro* hergestellte, artifizielle Gewebe) in den nächsten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnen. Die Zellen sind in einem solchen Konstrukt adhärent und haben eine große Kontaktfläche zum Trägermaterial. Sie sind in diesem Zustand weit aus sensibler bzgl. der Gefrierprozedur als suspendierte Zellen. Diese komplexen TE-Konstrukte stellen daher beim Konservierungsvorgang verschärfte Anforderungen an Technik und Verfahren. Es ist zu erwarten, dass mit der derzeit in den Freezern eingesetzten Technik und Sensorik keine erfolgreichen Kryoprotokolle entwickelt werden können.

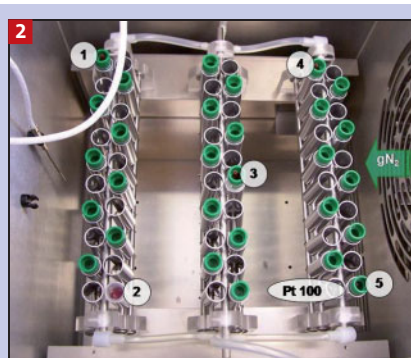
Seit mehreren Jahren beschäftigt sich das ILK Dresden mit der Kryokonservierung derartiger Konstrukte [1, 2]. Neben der Entwicklung eines „Kryoprotokolls an sich“ als Voraussetzung für eine erfolgreiche Entwicklung von Einfrierverfahren wurden aus diesem Grunde die Temperaturverteilung und verschiedene Kryoprotokolle eines kommerziellen Freezers mit verschiedenen Einbauten untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Proben thermometer des verwendeten Gerätes den Einfriervorgang nur ungenügend abzubilden vermag, so dass die Richtigkeit des durchgeführten Kryoprotokolls damit nicht exakt kontrollierbar ist. Die automatische Temperaturaufzeichnung des Gerätes ist letztlich nicht geeignet im Sinne einer Qualitätskontrolle, wie sie für die „Gute Herstellungspraxis“ (GMP) gefordert wird. Mit kleineren Sensoren wie Thermoelementen wurde zum Teil ortsaufgelöst die Temperaturverteilung im Freezer bei verschiedenen Einfrierprotokollen bestimmt. Es wurden z.T. erhebliche Temperaturdifferenzen zwischen den Messorten und wie erwartet auch zum Proben thermometer des Gerätes gefunden.

Material und Methoden

Alle hier vorgestellten Untersuchungen wurden in einem automatischen Einfriergerät ICE CUBE 15M (Fa. Sylab, Österreich) durchgeführt. Die Versorgung dieses Gerätes mit flüssigem Stickstoff erfolgt aus einem LN₂-Tank Apollo 200 (Fa. Cryotherm, Deutschland). (Abb. 1). Für die Versuchsrei-



1 Programmierbares automatisches Einfriergerät ICE CUBE 15M mit LN₂-Versorgungstank



2 Röhrenrack mit Angabe der Messortanordnung

hen wurden Kryoröhrchen (Vials) mit einem Volumen von 1,8 ml (VWR, Deutschland) gewählt, die in das Autoseeding-Rack für Ampullen von Sylab eingesetzt werden konnten (Abb. 2).

Für die Prozesskontrolle und zur Programmierung des Freezers stehen werksseitig zwei Pt 100 Widerstandsthermometer zur Verfügung. Ein Pt 100 misst die Kammer-temperatur (Kammerthermometer). Ein weiteres (Proben-thermometer) dient der Bestimmung der Temperatur in einer einzufrierenden Probe und ist dazu in eine solche einzubringen. Diese Probe ist dann nicht mehr steril und muss verworfen werden. Bei dieser Verfahrensweise geht man davon aus, dass während des Einfrierens am Messort und an allen anderen Orten gleiche Temperaturverhältnisse herrschen. Die Aufzeichnung der Prozessgröße „Temperatur“ im Freezer durch die eingebauten Pt 100 erfolgt ausschließlich in der gerätespezifischen Software und kann in der vorliegenden Version auch nicht ausgelesen werden. Inzwischen bietet der Hersteller des Gerätes eine Option zum Auslesen der Daten an. Für die ortsaufgelöste Temperaturmessung wurden tieftemperaturtaugliche Präzisions-Feindraht-Thermoelemente (TH) aus Kupfer-Konstantan (Typ T) (omega engineering, USA) mit Teflonisolierung verwendet. Der TH-Durchmesser beträgt 0,127 mm. Die Messwerte wurden über das Messwerterfassungssystem Medana (Delphin Technology, Deutschland) erfasst, ausgewertet und mit Hilfe von Excel aufbereitet. Die für Thermoelemente benötigte Referenzstelle lag für alle TH auf Raumtemperatur in einem thermisch isolierten Behälter. Die Berechnung der jeweils aktuellen Referenztemperatur sowie die Umrechnung von Thermospannung auf Temperatur erfolgen auch im genannten Messwerterfassungssystem. Für die Durchführung der Experimente wurden insgesamt 30 Kryoröhrchen mit 1,5 ml Kryomedium im Rack platziert.

Diese gefüllten Kryoröhrchen repräsentieren eine charakteristische Beladung eines solchen Röhrenracks. Von diesen 30 Röhrenchen wurden fünf mit Thermoelementen versehen und gemäß Messortanordnung (siehe Abb. 2) positioniert. Das Pt 100 des Freezers war in ein separates Vial eingebracht. Das Kryomedium (KM) ist eine Eigenentwicklung auf der Basis zellabhängigen Zellkulturmediums mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Hydroxyethylstärke (HES). Das Kryomedium in den Vials an den Messorten wurde nach jeder Messung erneuert, um Messartefakte durch mögliche Ausfällungs- oder Kristallisationseffekte zu vermeiden. Die Thermoelemente waren mit Hilfe sehr feiner Nadeln im Röhrenchen fixiert und mittig so positioniert, dass sich die Messstelle (Lötperle des TH) auf halber Höhe des Flüssigkeitsspiegels befand (siehe Abb. 3). Der Hersteller der TH gibt für die hier verwendeten Präzisionselemente einen Fehler von $\pm 0,4$ K an. Eine Überprüfung der Abweichungen für die Thermoelemente



3 Präparation der Messstelle (TH) in einem Kryoröhrchen

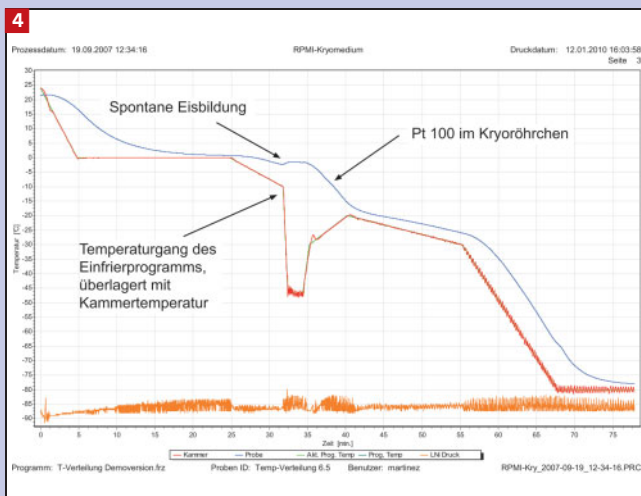
wurde bei 273 K und bei 77,4 K (LN₂) durchgeführt. Die Abweichungen zwischen allen Thermoelementen waren stets kleiner als 0,3 K. Außerdem wurden zu Kontrollzwecken alle fünf TH zusammen an jedem der fünf Messpunkte platziert und das Einfrierprogramm abgearbeitet.

Folgende Einfrierprogramme wurden erstellt und für die Tests verwendet:

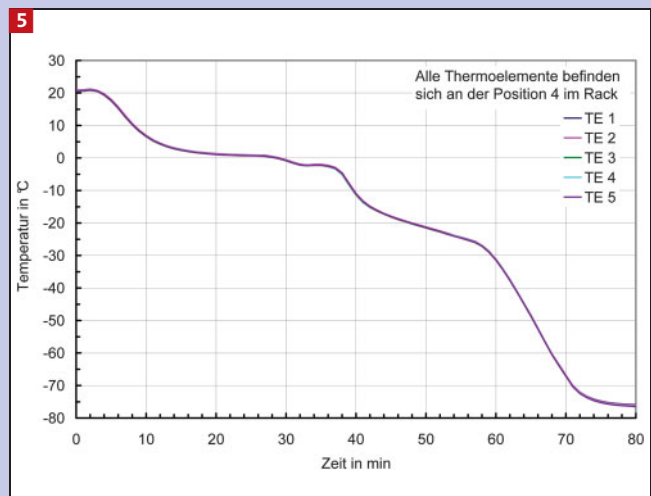
- stufenweise Einfrierung mit schneller Rampe
- kontinuierliche Einfrierung mit automatischem Seedingprozess
- kontinuierliche Einfrierung mit manuellem Seedingprozess.

Experimentelle Ergebnisse

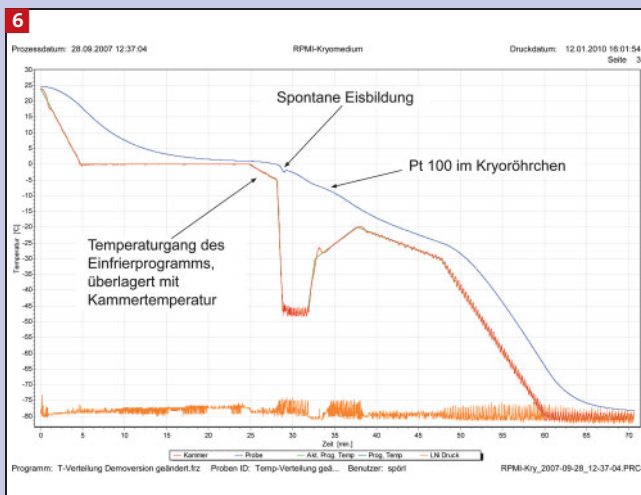
Zur Untersuchung der Temperaturverteilung im automatischen Einfriergerät ICE CUBE wurde eine sogenannte modifizierte Demoversion [3] ausgewählt, mit der im ILK Dresden Tissue Engineering Konstrukte (TE-Konstrukte) in speziellem, selbst entwickelten Equipment (Dose für die Aufnahme der TE Konstrukte und Rack für die Dosen) erfolgreich eingefroren werden können. Die Anwendung dieses Einfrierprotokolls auf die Kryokonservierung von Kryoröhrchen im dazugehörigen Autoseeding Röhrenrack (siehe Abb. 4) hat zur Folge, dass die Temperaturkurve des Pt 100 im Kryovial einen anderen Verlauf zeigt als bei den bisher mit Dosen durchgeführten Einfrierungen im selbst entwickelten Equipment. Deutlich ist der Prozess der spontanen Eisbildung trotz schneller Abkühlphase in Abb. 4 zu sehen. Dieses Einfrierprotokoll ist dennoch gut für die weiteren Untersuchungen geeignet und wurde für die Überprüfung der relativen Abweichungen der Thermoelemente untereinander verwendet. Zu diesem Zweck wurden alle fünf TH gemeinsam in nur ein Vial eingesetzt und dieses Vial nacheinander auf die Positionen wie in Abb. 2 angegeben, gebracht. Beispielhaft für diese Untersuchungen ist in Abb. 5 das Messergebnis für die Position 4: (oben rechts im Rack) angegeben. Der Temperaturverlauf aller fünf Thermoelemente auf einer Position zeigt keine erkennbaren Unterschiede. Dieses Verhalten konnte für alle fünf Positionen bestätigt werden. Damit ist der Nachweis erbracht, dass die in der Folge beobachteten Temperaturunterschiede an den jeweiligen Messplätzen (siehe Abb. 7) reale Effekte sind und sich nicht auf Messfehler reduzieren lassen. Außerdem wurde bei allen Versuchen festgestellt, dass sich die Kurvenverläufe des Pt 100 des Freezers und der Thermoelemente, unabhängig vom Messort, vor allem im Bereich der spontanen Eisbildung deutlich unterscheiden, wie es in den folgenden Bildern



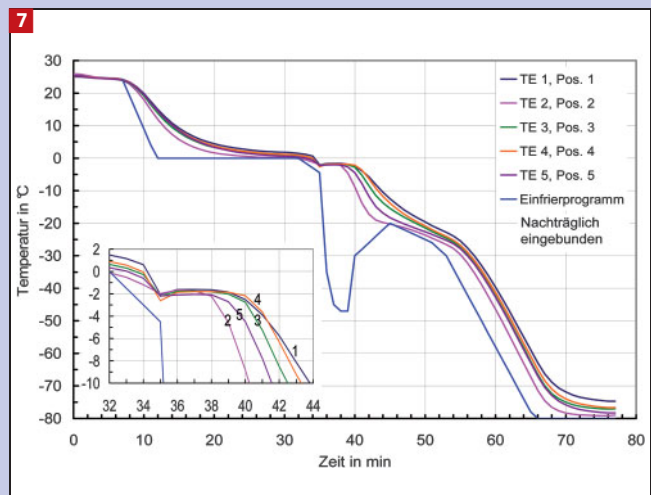
4 Einfrierprotokoll für die Kryoröhrchen in Autoseeding Röhrchenrack



5 Temperaturverlauf aller Thermoelemente (TH) in einem Kryoröhrchen an der Position 4



6 Geändertes Einfrierprotokoll für die Kryoröhrchen in Autoseeding Röhrchenrack



7 Temperaturverlauf an fünf verschiedenen Messorten im Rack (s. Bild 2) im Vergleich zum Temperaturverlauf, gemessen mit dem Pt 100 des Freezers

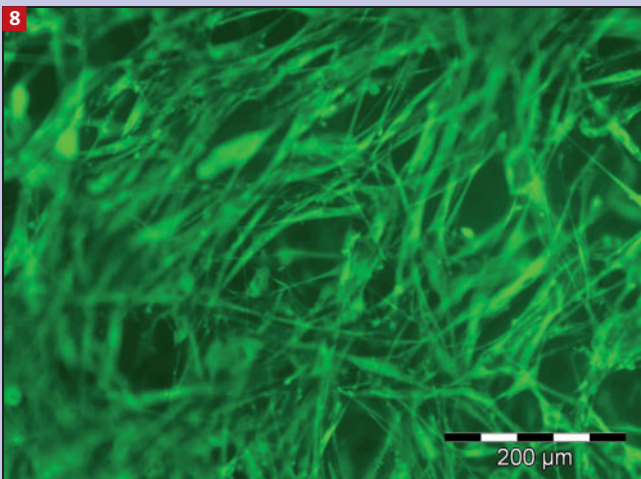
gut zu erkennen ist. Die untere, orangefarbene Kurve zeigt den Verlauf des LN₂-Druckes am Freezer während des Einfrierprotokolls.

Nach einer Veränderung im Einfrierprotokoll (Verlängerung der Haltezeit bei -55 °C) ist die spontane Eisbildung mit dem Pt 100 des Freezers kaum noch erfassbar (siehe Abb. 6). Ohne weitere Temperaturkontrolle am Probenort würde der Einfrierprozess ohne Kenntnis des tatsächlichen thermischen Verhaltens als geeignet eingestuft. Weil dieses Vorgehen der Praxis entspricht, wurden daher mit dem modifizierten Protokoll alle weiteren Untersuchungen durchgeführt, um die Auswirkungen dieses Vorgehens zu prüfen. Für die folgenden Einfrierprozesse sind die Thermoelemente in fünf Kryoröhrchen eingebracht und an verschiedenen Positionen (s. Abb. 2)

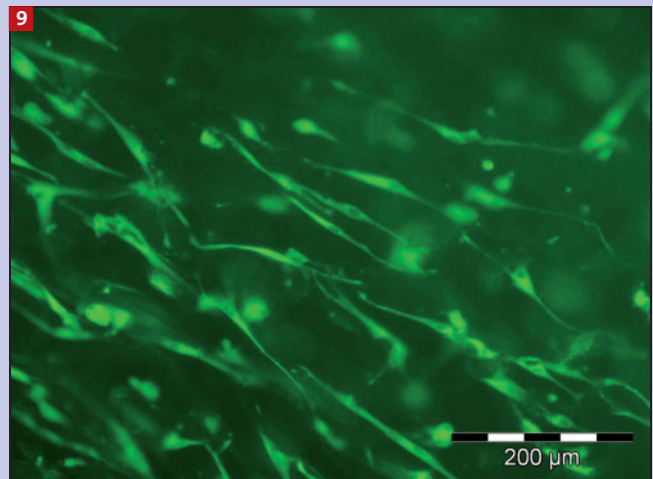
eingefroren worden. Beim Vergleich der beiden Temperaturregistrierungen (Pt 100 und Thermoelement) des geänderten Einfrierprotokolls ergeben sich deutliche Unterschiede im Kurvenverlauf (siehe Abb. 7). Die Kurven zeigen deutlich, dass man nicht von einer homogenen Temperaturverteilung in einem solchen Freezer ausgehen kann. Die schnelle Abkühlung (60 K pro min) reicht hier nicht aus, die spontane Eisbildung zu unterbinden. Daher ist eine zuverlässige Aussage zur Prozessführung allein mit dem Proben thermometer des Freezers nicht möglich. Außerdem unterscheiden sich die Temperaturverläufe an den unterschiedlichen Messorten im Freezer deutlich. Zu jedem Zeitpunkt des Einfrierprotokolls ist der Messort „2“ (unten links) der kälteste, obwohl er am weitesten vom Ort des Gaseintrittes entfernt ist. Der

Messort „1“ (oben links) ist ebenso weit davon entfernt, ist aber am wärmsten. Außerdem zeigen die kälteren Orte „2“ und „5“ (unten rechts) einen geringeren Ansatz zur spontanen Eisbildung als die anderen Messorte (siehe Insert in Abb. 7).

Mit Blick auf die Möglichkeit der Kryokonservierung von TE-Konstrukten in herkömmlichen Kryobehältnissen (Vials oder Beutel) wurden diese Untersuchungen auch mit Zellen durchgeführt. Dafür wurden mit Fibroblasten besiedelte Kollagenschwämmchen von ca. 1 cm² Probenfläche mit je 1,5 ml Kryomedium in Kryoröhrchen so eingebracht, dass die Kollagene aufgespannt und mit Medium bedeckt im Röhrchen fixiert waren. Diese Verfahrensweise war notwendig, um eindeutig die besiedelte Fläche identifizieren zu können. Vials mit diesen Kollagenen wurden an die Positio-



8 Erfolgreiche Kryokonservierung am Messplatz 5 (siehe Abb. 2)



9 Freezingschäden am Messplatz 1 (siehe Abb. 2)

nen „1“, „3“ und „5“ gebracht und die Einfrierung gemäß Abb. 6 durchgeführt. Leider war die Konservierung nur an den Orten „3“ und „5“ erfolgreich (siehe Abb. 8). Das beste Ergebnis wurde bei „5“ erzielt. Die Kontrolle des Zellzustandes erfolgte vor und nach der Konservierung durch die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DIO, welcher an die Lipiddoppelschicht der Zellmembran bindet und somit den Umriss und innere Strukturen der Zelle bei Fluoreszenz-Anregung im blauen Spektralbereich grün erscheinen lässt. Dabei sind die intakten Zellen im Kollagen sehr gut als aufgespannt zu erkennen. Durch die Kryokonservierung geschädigte Zellen lösen sich dagegen von der Oberfläche und nehmen eine sphärische Gestalt an („abkugeln“) oder zerfallen in Fragmente (siehe Abb. 9). Von dem erreichten positiven Ergebnis kann man nicht darauf schließen, dass an der überwiegenden Anzahl der Plätze im mittleren und rechten Bereich des Racks (siehe Abb. 2) ähnlich gute thermische Verhältnisse herrschen und damit eine Kryokonservierung dort erfolgreich sein kann.

Oftmals wird das Seeding-Verfahren zur Unterbindung der spontanen Eisbildung empfohlen. Bei diesem Prozess wird in einer kurzen und definierten Zeitspanne direkt flüssiger Stickstoff durch die dafür vorgesehenen Leitungen am Rack gefördert (siehe Abb. 2). Bei unseren Versuchen hat die Durchführung eines Seedingprogramms zu keiner deutlichen Unterbindung der spontanen Eisbildung geführt. Möglicherweise ist dafür ein Problem in der Steuerung des Seedingprozesses im verwendeten Gerät verantwortlich. Ungeachtet dessen bleibt aber ein grundsätzliches Problem beim Seeding: Zu Beginn des Vorgangs haben diese Leitungen „nur“ die Temperatur

der Kammer, bei welcher der Seedingprozess ausgelöst werden soll. Die Differenz zwischen der Kammertemperatur und der Temperatur des einströmenden Stickstoffgases reicht dann aus, um die spontane Eisbildung auszulösen.

Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden alternativ zum automatischen Seeding Versuche mit einem „manuellen Seeding“ durchgeführt. Dabei wurde eine mit LN₂ gefüllte, nicht isolierte Metallflasche direkt an das Rack angeschlossen und das kalte Gas zur Vorkühlung der Leitungen genutzt. Nur wenn diese Verfahrensweise angewendet wurde und das Seeding deutlich einige Grade oberhalb der Temperatur der spontanen Eisbildung einsetzte, konnte in einigen Fällen selbige unterbunden werden. Dies zeigt zumindest auf, dass die Vorkühlung der Leitungen eine nicht unwesentliche Rolle beim Seeding spielt.

Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass für Zellsuspensionen der beim Abkühlprozess noch auftretende kleine thermische Effekt (siehe Abb. 6), verursacht durch die spontane Eisbildung, akzeptabel sein kann, da die Zellen in Suspensionen abgekühlt vorliegen und dadurch offensichtlich thermischen Stress besser tolerieren. Dafür sprechen auch viele praktizierte Einfrierprotokolle für Zellsuspensionen. Für adhärenente Zellen oder Gewebe ist diese Einfriermethode nicht als Standardmethode zu empfehlen. Die örtliche Unbestimmtheit der Temperaturverhältnisse während des Einfrierprozesses gefährdet das kontrollierte und reproduzierbare Einfrieren größerer Gewebestücke.

Sollen zukünftig TE-Konstrukte oder Gewebe in automatischen Einfriergeräten kryo-

konserviert werden, sind Maßnahmen zur Sicherstellung einer homogeneren Temperaturverteilung zu treffen. Diese können sich auf die Prozessführung im Freezer und/oder die Gestaltung der Einfriereinheit bis hin zum Einfrierbehältnis erstrecken. Aus diesem Grunde wurde im ILK Dresden in den letzten Jahren an dieser Problematik gearbeitet.

Zusammenfassung

Mit den hier vorgestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die zur Zeit erhältlichen Einfriergeräte nur bedingt den Anforderungen entsprechen, um natürliche und mit dem Verfahren des Tissue Engineering hergestellte Gewebe für Gewebebanken zuverlässig einfrieren zu können. Daraus ergibt sich ein noch erheblicher Entwicklungsbedarf.

Die am genannten Freezer exemplarisch durchgeführten Untersuchungen wurden auch durch Arbeiten im Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert an Freezern anderer Hersteller bestätigt. Ohne weitere Entwicklungen an diesen Freezern und deren Zubehör ist mit Problemen zu rechnen, wenn komplexe biologische Systeme damit eingefroren werden sollen.

Literaturverzeichnis

- [1] Spörl, G., Eckelt, U., Lauer, G., Klingner, E.: Cryopreservation of Tissue Engineered Mucosa. 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 29.05.–02.06.2007 in Rostock-Warnemünde
- [2] Spörl, G., Mai, R., Klingner, E., Gedrange, T., Lauer, G.: Cryopreserved tissue engineered mucosa. *Folia Histochem Cytobiol.* 46 (2008) 4, S. 541–54
- [3] abgeleitet aus: Martin, M., Becker, H. D.: Kryokonservierung von definierten Zellverbänden. *Offenlegungsschrift DE 10 2005 009 065 A1*