

Die ersten Berichte über Funktionserhaltung lebender Organismen nach Anwendung tiefer Temperaturen stammen aus dem 17. Jahrhundert (Boyle 1683). So können manche Tiere wie der kanadische Waldfrosch und Pflanzen bei tiefen Temperaturen z.B. im Eis überleben.

Zell- & Gewebeersatz-Therapien sind bedeutende Ansätze der Regenerativen Medizin. Eine effektive Lagerung des biologischen Ausgangsmaterial ist allerdings nur durch Konservierung bei Temperaturen unterhalb  $-135^{\circ}\text{C}$  möglich. Durch den Einsatz moderner Kryotechnik können intrinsische Schädigungsmechanismen erheblich reduziert werden.

Am Institut für Mehrphasenprozesse und Zentrum für Biomedizintechnik werden mit Unterstützung vom Exzellenzcluster REBIRTH Techniken und Methoden zur effektiveren Kryokonservierung von (Stamm-) Zellsuspensionen, Geweben und biohybriden Gewebekonstrukten systematisch erforscht und bereitgestellt.

Institut für Mehrphasenprozesse  
Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher, M.Sc.

[www.ifv.uni-hannover.de](http://www.ifv.uni-hannover.de)



11  
102  
1004  
Leibniz  
Universität  
Hannover

Institut für Mehrphasenprozesse

Callinstr. 36, DE-30167 Hannover, Prof. Dr.-Ing. B. Glasmacher, M.Sc.

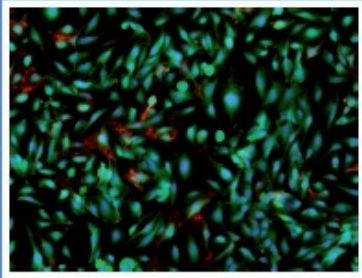
Leben  
aus dem Eis





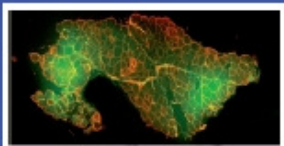
## Kryokonservierung von Zellen

Mittels systematischer Parameteroptimierung werden an verschiedenen Zellmodellen geeignete Gefrierprotokolle erarbeitet und optimale Kryoprotektiva (CPA, Cryoprotective agent) ermittelt. Dabei werden sowohl die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Reaktivierbarkeit von Zellen als auch der Einfluss zelleigener Stress-Schutzmechanismen sowie der biologische Zustand der Zelle zur Optimierung der Kryokonservierungsstrategie getestet.



## Kryokonservierung von Gewebe

Eine besondere Herausforderung stellt die Kryokonservierung von dreidimensionalen Strukturen wie nativem Gewebe und Gewebersatzmaterial bzw. Tissue Engineered Products (TEPs) dar. Bei der Optimierung von Einfrier- und Auftauparametern ist hier insbesondere die Beachtung der Temperatur- und CPA-Verteilung sowie des Vorhandenseins verschiedener Zelltypen innerhalb eines 3D-Gewebeverbandes erforderlich. Für das Gewebe- und Tumorbanking werden Kryokonservierungsstrategien entwickelt, die physiologische Untersuchungen an aufgetauten Proben ermöglichen.



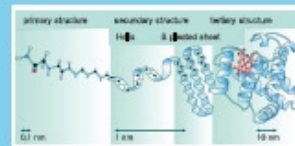
## Kryoadditive



Mit Hilfe der Differentialkalorimetrie (DSC) können für die Kriobiologie bedeutende physikalische Eigenschaften von Kryoadditiven (cryoprotective agents, ice-blockers, vitrifi-cants) untersucht werden. Es werden hiermit Phasenübergänge von Kryoadditiven, darunter die Gleichgewichtsfriertemperatur  $T_m$ , die homogene Nukleationstemperatur  $T_h$ , Glasübergangstempertur  $T_g$ ,  $T_g'$  und die Devitrifikationstemperatur  $T_d$ , analysiert. Ergänzend können mit der Kryomikroskopie Eiskristallstrukturen (z.B. intrazelluläre Eiskristallbildung) und Membranintegrität von biologischen Zellen visuell dargestellt werden.

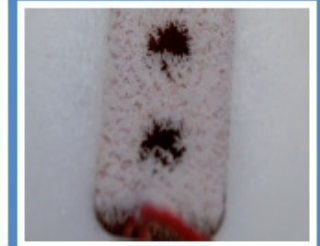
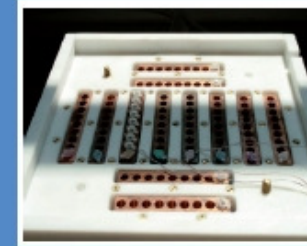
## Membranveränderungen

Biokonservierung umfasst die Kryokonservierung und die Gefriertrocknung und erhöht die Haltbarkeit von Biomaterial im gekühlten, gefrorenen und getrockneten Zustand. Diese Techniken beruhen auf eine Verlangsamung der chemischen Degenerationsreaktionen. Während des Konservierungsprozesses werden biologische Strukturen unphysiologischen Einflüssen ausgesetzt, diese führen zu Phasenwechseln, strukturellen- und chemischen Veränderungen der Zellmembranen und Proteine. Wir verwenden spektroskopische Techniken (FTIR) um die Effekte des Gefrierens und Trocknens auf biologische Proben zu untersuchen und entwickeln optimierte Konservierungsmethoden für biomedizinisch relevante Zellen und Geweben.



## Controlled rate freezer-Entwicklung

Kommerziell erhältliche Systeme sind heute noch nicht optimal zur Kryokonservierung von Zellen und Geweben geeignet. Aus diesem Grund werden neue Systeme entwickelt, die für die jeweiligen Aufgabenstellungen ausgelegt sind.



So wurde zum Beispiel der  $\mu$ -Freezer entwickelt. Er zeichnet sich durch eine parallele Prozessführung von bis zu 12 Kühlprotokollen aus. So können in einem Ansatz bis zu 96 sehr kleine Proben (2  $\mu$ l) konserviert werden. Das System ist für die Optimierung von der Kryokonservierung von Stammzellen und anderen wertvollen Zellen konzipiert.

## Nukleationskontrolle durch Elektrofrierung

Die Nukleation ist ein wichtiger Prozessparameter bei der Kryokonservierung biologischer Proben. Unter anderem bestimmt die Nukleationstemperatur die Eiskristallbildung, Konzentration von Lösungen und das osmotischen Verhalten von Zellen und Zellsystemen. Bei dem Gleichgewichtsfrieren (conventional slow cooling) besitzen verschiedene Zelltypen dabei ein unterschiedliches Optimum der Nukleationstemperatur, die mittels Electrofreezing aktiv kontrolliert werden kann.

