

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung von Zellen

3.1.1 Gewinnung fetaler Mäusecalvariencellen

Zur Gewinnung des Zellmaterials wurde von 18 Tage trächtigen Mäusen der Uterus mit den Feten unter sterilen Bedingungen entnommen. Tag 0 war der Tag der Konzeption. Aus den Uteri wurden die Feten präpariert und in eine sterile Hanks Salzlösung überführt. Mit Hilfe einer Schere wurden die Schädeldecken der Mäusefeten durch einen zirkulären Schnitt abpräpariert, von Haut und Periost gesäubert und wiederum in einer Hanks Salzlösung gesammelt und dreimal gespült. Es folgte eine mechanische Zerkleinerung der Kalotten zu ca. 1 mm² großen Fragmenten, um der folgenden enzymatischen Zellfreisetzung durch Kollagenase eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten. Die Knochenfragmente wurden in eine 0,2 prozentige Kollagenaselösung (Seromed Biochrom KG, Berlin) überbracht und für 10 Minuten bei leichter Bewegung in einem Wasserbad von 37°C inkubiert. Der Überstand aus dieser Lösung wurde verworfen und die Calvarien wurden in einer frischen 0,2 prozentigen Kollagenaselösung erneut für 60 Minuten inkubiert, ebenfalls in einem Wasserbad bei 37°C. Danach wurde die entstandene Zellsuspension durch wiederholtes Pipettieren homogenisiert, die Kollagenase hatte zu diesem Zeitpunkt die Knochenzellen aus den Knochen herausgelöst. Die mechanische Homogenisierung sollte den Prozess schonend unterstützen ohne die Knochenzellen zu zerstören. Der Verlauf der enzymatischen Zellfreisetzung wurde in Proben der Suspension unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Um die Knochenfragmente nun von der Zellsuspension in der Kollagenase zu trennen und die Zellen zu vereinzeln, wurde die Lösung durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 20 µm filtriert. Damit die Zellen von der Kollagenase befreit werden konnten, wurde die Zellsuspension bei 700 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend in einem frisch angesetzten Medium erneut zentrifugiert, der Überstand auf dem Zellsediment wurde verworfen. Das Zellsediment konnte nun zur Herstellung der Organoidkulturen verwendet werden.

3.1.2 Gewinnung fetaler Mäuseepiphysenzellen

Zur Gewinnung von Zellkulturen aus Epiphysenzellen wurden 18 Tage trächtigen Mäusen die Uteri entnommen. Die steril gewonnenen Feten wurden mit Hanks Lösung gespült. Mit Hilfe von sterilen Skalpellern konnten nun die Gliedmaßen der Feten einschließlich der großen Gelenke (Hüfte und Schulter) entfernt und von Haut und umgebendem Gewebe befreit werden. Die fetalen Extremitäten wurden nach der Präparation dreimal mit Hanks Salzlösung gespült und danach für 40 Minuten in einer 0.1 prozentigen Dispaselösung (Boehringer, Mannheim) in einem Wasserbad bei 37°C bei leichter Bewegung inkubiert. Durch die enzymatische Behandlung konnte weiteres Weichgewebe entfernt werden.

Nach der Spülung wurden sie für 40 Minuten in einer Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%) im Wasserbad inkubiert. Nach dieser enzymatischen Vorbehandlung konnten nun die knorpeligen Epiphysen von den mineralisierten Diaphysen entfernt werden. Um die Knorpelzellen vom Gewebe und voneinander zu trennen, wurden die Epiphysen zunächst für 15 Minuten und anschließend erneut für 30 Minuten in eine 0,2 prozentige Collagenaselösung überführt. Diese Inkubation geschah im Wasserbad bei 37°C und leichter Bewegung.

Um Gewebereste zu entfernen und die Zellen zu separieren, wurde die entstandene Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit der Porengröße 20 µm filtriert und nachfolgend bei 700 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Collagenase wurde abgossen und das Zellpellet erneut mit frischem Medium für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet konnte verworfen werden, aus dem reinen Zellsediment wurden Organoidkulturen gefertigt.

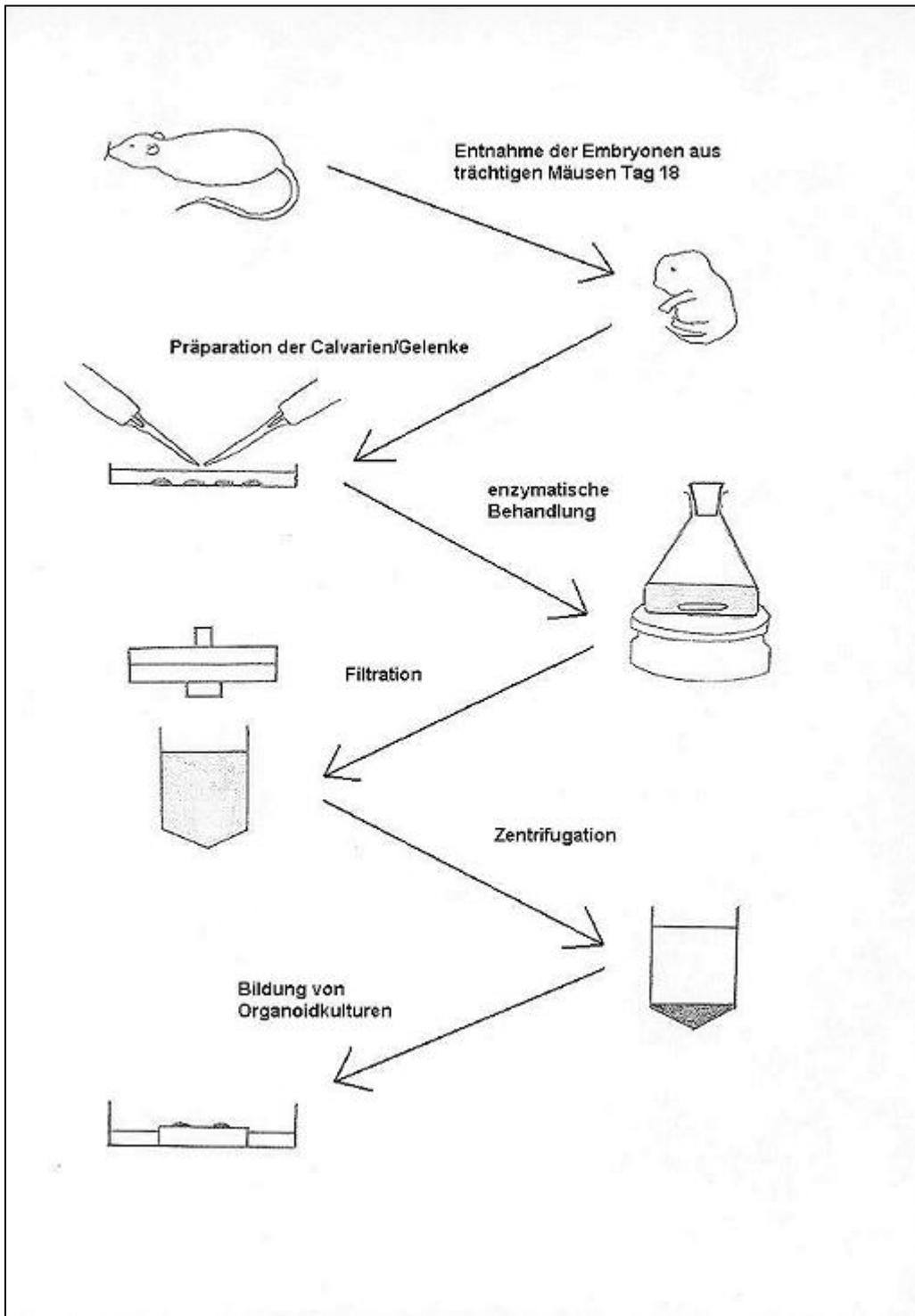


Abbildung 2: Gewinnung der Mäusecalvarien- und Mäuseepiphysenzellen

3.2 Herstellung von Organoidkulturen

Die Versuche wurden mit Hilfe von Organoidkulturen durchgeführt. Diese Art der in vitro Kultivierung ermöglicht eine sehr hohe Zelldichte mit Kulturen an der Medium-Luftgrenze, wobei die sehr differenzierten Zellen histotypische, organoide Strukturen bilden (Zimmermann, 1992).

Aufbau einer Organoidkultur:

In eine 35 mm Petrischale wurden 2 ml Nährmedium gegeben. Es bestand aus DMEM/HAM's F12 mit 2% iFCS (bei 56°C für 30 Minuten inaktiviertes fetales Kälberserum), 100 µg/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 150 µg/ml Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, mit einer Endkonzentration von 1,95 mM Calciumionen), 50 µg/ml Ascorbinsäure und nichtessentiellen Aminosäuren.

In jede Petrischale wurde ein Edelstahlgitterbänkchen mit den Maßen 15 mm Länge, 5 mm Breite, 3 mm Höhe und 1 mm Gittergröße gestellt. Auf diese „Grids“ wurden Zelloosenitratfilter mit 0,2 µm Porengröße gelegt (Lewis und Irving, 1970). Mittels einer Eppendorf-Varipette wurden auf jeden Filter 2 Zellkulturtropfen von jeweils 6 µl ($\pm 1,5 \times 10^6$ Zellen) aus den zuvor bereiteten Zellpellets (s. 3.1.1 und 3.1.2) aufgetragen. Durch diesen Aufbau erreicht man Zellkulturen mit 6-8 Zelllagen (Zimmermann et al., 1990; Zimmermann, 1992).

Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium erneuert. Die Organoidkulturen wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 7,5 Vol.% CO_2 inkubiert.

Um eine Osteoidmatrixmineralisation zu initiieren, wurde ab dem 7. Tag nach begonnener Inkubation β -GP (Natrium- β -Glycerophosphat) in einer Dosierung von 5 mM Nährmedium zugesetzt (Zimmermann et al., 1990; Zimmermann, 1992).

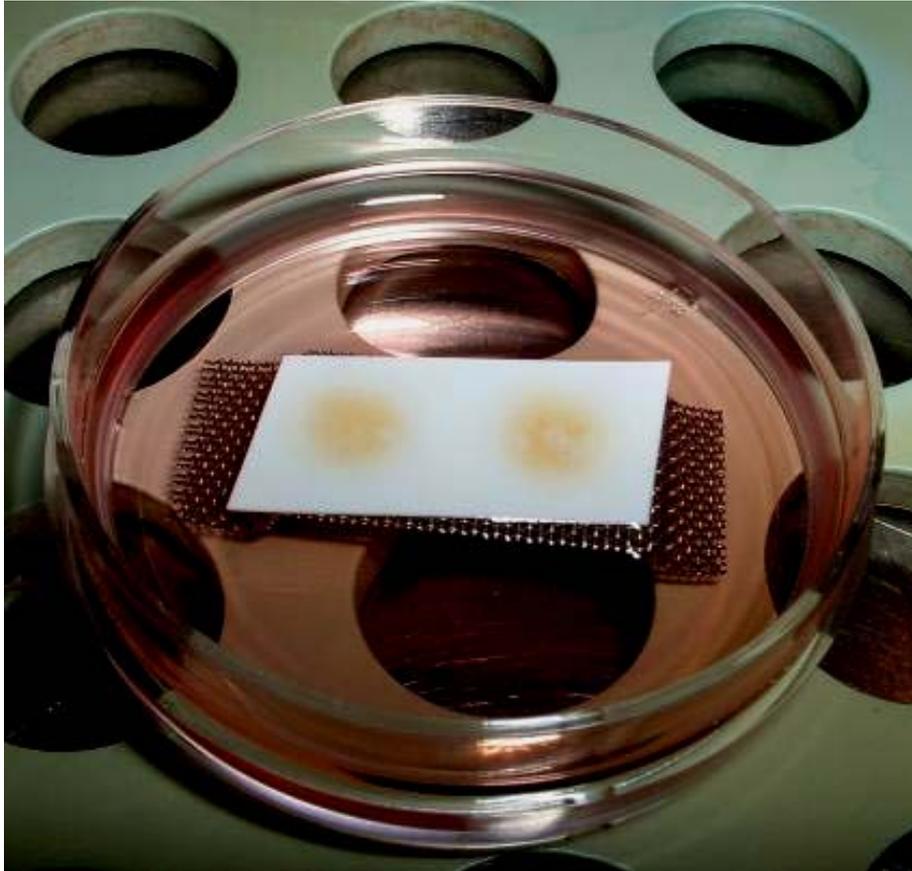


Abbildung 3: Organoidkultur mit zwei Zellkulturen.

3.3 Versuchsdurchführung

3.3.1 Behandlung der Kulturen mit hyperbarem Sauerstoff

Zur Behandlung der Organoidkulturen mit hyperbarem Sauerstoff wurden sie mit ihren Petrischalen in einen handelsüblichen Schnellkochtopf gesetzt, der zuvor durch ein Manometer und ein zusätzliches Ventil am Deckel ergänzt wurde. Der Topf wurde zunächst ca. 1 cm mit Wasser gefüllt. In dem Wasser standen Plastikbänkchen mit 4 cm Höhe, auf die die Petrischalen gestellt wurden. Um für die Kulturen gleichbleibende Temperaturen zu gewährleisten, wurde auch der Topf ständig bei 37° C inkubiert. Der Topf wurde luftdicht verschlossen.

Über das Ventil konnte nun das Sauerstoffgemisch (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) eingefüllt werden. Ohne Druckaufbau wurde der Topf zunächst mit diesem Gas gespült, um die Normalatmosphäre auszuwaschen.

Danach wurde mit dem Gasgemisch ein Druck von 2 bar (= 1500 mmHg) im Topf erzielt. Nach dem Druckaufbau wurde der Topf bei 37°C inkubiert.

Nach einer Stunde wurden die Petrischalen mit den Organoidkulturen aus dem Topf entnommen und wieder in die Inkubationsschränke verbracht.

3.3.2 Behandlung der Kulturen mit Sauerstoff

Sollten die Kulturen nur mit Sauerstoff behandelt werden, wurden sie in den oben beschriebenen Schnellkochtopf gesetzt. Er wurde danach mit dem Sauerstoffgemisch von 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid „gespült“. Ohne Druckaufbau wurde diese Atmosphäre im verschlossenen Topf für eine Stunde und bei einer Inkubationstemperatur von 37° C belassen.

3.3.3 Behandlung der Kulturen mit Druck

Sollte der Versuch nur mit Druck durchgeführt werden, wurden die Organoidkulturen im Topf einer normalen Atmosphäre ausgesetzt, der Topf wurde also nicht mit einem Gasgemisch gefüllt. Der Druck im Topfinneren wurde allein mit Druckluft aufgebaut. Die Inkubation erfolgte wiederum für eine Stunde bei 37° C.



Abbildung 4: Handelsüblicher Schnellkochtopf mit Manometer und zusätzlichem Ventil, in dem der notwendige Sauerstoffdruck gehalten und kontrolliert werden konnte.

3.3.4 Zeitlicher Ablauf der Versuche

Zur Bewertung des Zellstoffwechsels in den Knochenkulturen wurden zwei verschiedene Versuchsserien gewählt, um Veränderungen in Abhängigkeit von der Zeit festzustellen.

Versuchsserie 1 (zeitlicher Ablauf 1):

Die Organoidkulturen wurden 6 Tage mit einem Medium bestehend aus DMEM/HAM's F12 und 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum inkubiert. Ab dem 7. Tag wurde allen Kulturen zur Initiierung der Osteoidmatrixmineralisation 5 mM Natrium-β-

Glycerophosphat (β -GP) zugesetzt. Die Kulturen wurden für weitere 8 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Ab Tag 15 wurden die Kulturen täglich eine Stunde für insgesamt 8 Tage behandelt. Einen Tag und 4 Tage nach abgeschlossener Behandlung wurde in den Kulturen der Calciumgehalt und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen.

Die Kontrollkulturen wurden während dieser Zeit weiter bei 37°C inkubiert. Am 23. bzw. 26. Tag (am Ende des Versuchs) wurden Calcium und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Kulturen bestimmt.

Zeitschema für Versuchsserie 1:

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Kontrolle über 9 Tage	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
8 Tage Behandlung +1 d	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
Kontrolle über 12 Tage	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8 Tage Behandlung + 4 d	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 5: zeitlicher Ablauf für Versuchsserie 1

■ = Kultivierung mit Mediumwechseln, ab Tag 7 Zugabe von β -GP in das Medium

■ = Behandlung mit HBO, Sauerstoff oder Druck

■ = Messung von Calcium und Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Versuchsserie 2 (zeitlicher Ablauf 2):

Die Organoidkulturen in Versuchsserie 2 wurden ebenfalls für 6 Tage in DMEM/HAM's F12 und 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum inkubiert. Zur Initiierung der Osteoidmatrixmineralisation wurden nach den 6 Tagen jeweils 5 mM Natrium- β -Glycerophosphat (β -GP) zugesetzt. Ab dem 15. Tag wurde mit der Behandlung begonnen, wobei die Kulturen für 7 Tage, 5 Tage, 3 Tage oder nur für einen Tag täglich für eine Stunde behandelt wurden. Einen Tag nach abgeschlossener Behandlung wurde in den Kulturen der Calciumgehalt und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen. Die Kontrollkulturen wurden währenddessen weiter bei 37°C inkubiert.

Zeitschema für Versuchsserie 2:

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Kontrolle	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■
1 Tag Behandlung + 1 d	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■
3 Tage Behandlung + 1 d	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■
5 Tage Behandlung +1 d	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■
7 Tage Behandlung +1 d	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 6: zeitlicher Ablauf für Versuchsserie 2

- = Kultivierung mit Mediumwechseln, ab Tag 7 Zugabe von β -GP in das Medium
- = Behandlung mit HBO, Sauerstoff oder Druck,
- = Messung von Calcium und Aktivität der Alkalischen Phosphatase

3.4 Bestimmung der Differenzierung und Mineralisation

3.4.1 Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität

Nach Versuchsdurchführung und Kultivierung der Organoidkulturen wurden die Zellulosenitratfilter zweigeteilt, um die Kulturen voneinander zu trennen. Jede Kultur wurde einzeln zweimalig mit 0,9 prozentiger Kochsalzlösung gespült, um sie von Mediumresten zu reinigen. Anschließend konnten die einzelnen Kulturen in Eppendorfgefäße verbracht werden, die jeweils mit 750 μ l destilliertem Wasser gefüllt waren. Darin wurden sie jeweils 30 Sekunden mit Hilfe eines Ultra-Turraxgerätes (IKA-Labortechnik) homogenisiert und anschließend bei 7000 UpM zentrifugiert.

Je 250 μ l des Überstands wurden danach in Eppendorfgefäße pipettiert, um darin die Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu bestimmen.

Die Aktivitätsmessung wurde mit Hilfe eines Testkits (Test-Combination Alkalische Phosphatase opt.) der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Die fertige Testsubstanz enthielt 10 mmol/l Natrium-p-Nitrophenylphosphat und 0,5 mmol/l $MgCl_2$ in 1 mol/l Diäthanolamin-Puffer, pH 9,8.

Drei Milliliter dieser Lösung wurden in eine Küvette mit 1 cm Schichtdicke pipettiert und mit 100 µl des Überstands gemischt.

Das Enzym Alkalische Phosphatase katalysiert die chemische Reaktion:



Das in dieser Reaktion entstehende Produkt p-Nitrophenyl ist eine farbige Substanz.

Die katalytische Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde anhand der farbigen Menge an p-Nitrophenyl als photometrische Absorptionszunahme während einer Zeit von 3 Minuten bei einer Wellenlänge von 405 nm ($\Delta E_{405\text{nm}}$) gemessen.

Um die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der Probe zu berechnen, wurde nach Angaben des Testkit-Herstellers folgende Formel verwendet:

$$U/l (25^\circ \text{C}) = 3300 \times \Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}$$

Man erhielt dadurch die Aktivität der ALP in der Probe als mU/ml (Boehringer Mannheim GmbH, 1977). Um die ALP-Aktivität pro Kultur zu erhalten, musste der berechnete Wert mit 0,75 multipliziert werden. Das Ergebnis war die Aktivität der ALP in mU/Kultur.

3.4.2 Bestimmung des Calciumgehalts

Zur Bestimmung des Calciumgehaltes der Organoidkulturen wurden die restlichen 500 µl des Zellhomogenats (s. o.) verwendet.

Um das Calcium aus den Kulturen zu lösen, wurde das Homogenat für 24 Stunden bei Raumtemperatur mit 1 N Salzsäure versetzt (Zimmermann et al., 1992). Nach dieser Zeit wurde die Calciumkonzentration flammenphotometrisch bestimmt (Flammenphotometer ELEX 6361, Eppendorf, Hamburg).

Im Photometer wurde die Flüssigkeit durch einen Zerstäuber vernebelt und in eine Flamme gebracht. Das von dem Calcium in der Flamme emittierte spezifische Spektrum wurde selektiert und in elektrische Potenziale gewandelt. Die Stärke der Lichtemission war proportional zur Calciumkonzentration in der gemessenen Probe.

Mit Hilfe der zusätzlichen Messung von Standards konnte so auf die absolute Calciumkonzentration in den einzelnen Proben geschlossen werden.

3.5 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Da wegen der oft zu geringen Anzahl (N) der Kulturen pro Behandlung meist mehrere Versuchsserien durchgeführt wurden und die absoluten Werte der Parameter in den verschiedenen Versuchserien zum Teil stark differierten, wurden alle Werte auf die unbehandelten Kontrollen mit der kürzesten Inkubationszeit = 100% bezogen. Somit konnten alle Werte einer Behandlungsart zusammengefasst werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 8,0 for Windows Student Version. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Programm Microsoft Excel ermöglicht.

Aus den einzelnen Messwerten zu den Versuchen und den Kontrollen wurde jeweils das arithmetische Mittel bestimmt und die Standardabweichung berechnet. Die statistische Signifikanz wurde bei gleichen gepaarten Stichproben mit dem Student-t-Test berechnet.

Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angegeben.