



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Etablierung von 3-D-Zellkulturmodellen zur Untersuchung der De- und Redifferenzierung chondrogener Zelltypen

Autor: Sven Lukas Reutter
Institut / Klinik: Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
Doktormutter: Prof. Dr. N. Rotter

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass chondrogene Zellen (CC und CPC) nasalen und aurikulären Ursprungs Sphäroide mit einer Zellzahl kleiner als 1×10^5 Zellen/Sphäroid und in einer scaffold- und matrixfreien Umgebung formen. Es wurden Sphäroide mit $2,5 \times 10^4$ bzw. 5×10^4 Zellen/Sphäroid gebildet. Sphäroide dieser Größe erlaubten eine Weiterverarbeitung für folgende Analysemethoden wie zum Beispiel der Immunhistochemie. Die Vitalität der Zellen im Sphäroid wurde mit Fluoreszenzfarbstoffen für tote Zellen (SYTOX™ Green), aber auch für lebende Zellen (ATP-Red Live Cell Dye) bestimmt. SYTOX™ Green erwies sich auch als spezifisch und als tauglich, die Vitalität der Zellen permanent während der Zellkulturphase zu bestimmen. Die Analyse histologischer Schnitte zeigt aber, dass sich auch lebende Zellen in den SYTOX™ Green-positiven Arealen befinden. Dies wurde auch durch den Vitalfarbstoff gezeigt. Da eine Färbung mit SYTOX™ Green alleine nicht ausreichend ist, um die Qualität des Sphäroids bezüglich Zellvitalität zu bestimmen, empfiehlt es sich eine Doppelfärbung mit einem Vitalfarbstoff durchzuführen.

Auch eine Chondrogenese konnte in den Sphäroiden beobachtet werden. Diese zeigte sich aber stark von den verwendeten Zytokinen, bzw. von der Zellmedienzusammensetzung abhängig. Die Entwicklung eines passenden Zellkulturmediums ist zentral für die Schaffung optimaler Zellkulturbedingungen zur Induktion der Chondrogenese. Es wurde gezeigt, dass bei den hier verwendeten Medien alle Zelltypen begannen Elastin zu exprimieren. Insbesondere auch Zellen hyalinen Phänotyps, obwohl Elastin ein Merkmal für einen elastischen Knorpelphänotypen ist. Um die Entwicklung des gewünschten Phänotyps, hyalin oder elastisch, zu steuern, müssen die richtigen Zellkulturmediumzusätze gefunden bzw. entwickelt werden. Welche Komponenten hierfür im Medium exakt benötigt werden, muss in weiteren, tiefergehenden Versuchen evaluiert werden.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Sphäroide mit niedriger Zellzahl einer in der Knorpelforschung etablierten Methode, wie der Mikromassenzellkultur, zumindest gleichwertig sind und in Zukunft als Modell dienen können.