

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Das Hühnerei: Alternative Ansätze für das Tissue Engineering

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

vorgelegt von Diplom Chemiker Elmar Mohrhardt

geboren am 11.11.1984 in Kaiserslautern

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Dissertationsgutachter: Prof. Dr. G. R. Fuhr

Prof. Dr. J. Engel

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am
Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) St. Ingbert
in der Hauptabteilung Bioprozesstechniken und Nanotechnologie durchgeführt.

<i>Zusammenfassung</i>	<i>I-II</i>
<i>Summary</i>	<i>III</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Aufgabenstellung	1
1.2	Tissue Engineering	3
1.3	Das Vogelei als „natürlicher Bioreaktor“	12
2	<i>Material und Methoden</i>	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Verbrauchsmaterial und Gebrauchsgegenstände	26
2.1.3	Geräte	27
2.1.4	Zellkulturmedien und Arbeitslösungen	29
2.1.5	Zelllinien und Primärzellen	31
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur	31
2.2.2	Färbungen	36
2.2.3	Zytotoxizitätstests	38
2.2.4	Isolierungen und Präparationen	40
2.2.5	Kultivierung von Hühnerembryonen	45
2.2.6	Technische Verfahren	47
2.3	Entwicklungen	49
2.3.1	Deckelsystem für In-ovo-Kulturen	49
2.3.2	Inkubator für eine In-ovo-Kultur	53
2.3.3	Inkubator für mehrere In-ovo-Kulturen	57
3	<i>Ergebnisse</i>	62
3.1	Technische Entwicklungen	62
3.1.1	Evaluation des Deckelsystems für In-ovo-Kulturen	62
3.1.2	Evaluation des Inkubators für eine In-ovo-Kultur	69
3.1.3	Evaluation des Inkubators für mehrere In-ovo-Kulturen	78
3.1.4	Vollständig künstliche Schalensysteme	80

3.2	Biologische Untersuchungen	102
3.2.1	Eignung des Hühnereies für die Kultivierung von Fremdzellen	102
3.2.2	Retardierung der Entwicklung des Embryos	121
3.2.3	Anschluss von Fremdgewebe an das Gefäßsystem des Embryos	124
4	Diskussion	127
5	Literaturverzeichnis	144
6	Anhang	149
7	Publikationen/Dank	151
8	Lebenslauf	153

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Ansatz für das Tissue Engineering theoretisch und praktisch auf seine Durchführbarkeit und Erfolgsaussichten hin untersucht. Die Generierung dreidimensionaler Gewebe in-vitro gelingt aktuell nicht. Der Grund hierfür wird in der unzureichenden Versorgung der in der Tiefe des Gewebes liegenden Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff vermutet. Die zielführendste Lösung dieses Problems wäre die Versorgung dieser Zellen durch ein Blutgefäßsystem.

Um diese Annahme zu überprüfen, bedarf es eines geeigneten Testsystems. Will man ein Gewebe an ein Blutgefäßsystem anschließen, so muss das Testsystem die Kultivierung dieser Gewebe erlauben und ein geeignetes Gefäßsystem zur Verfügung stellen. Der sich entwickelnde Vogelembryo bietet ein hochproliferatives Gefäßsystem und lässt eine Eignung zur Kultivierung von Zellen und Geweben vermuten. Auch bildet das Vogelei die Vorlage für ein technisches Inkubationssystem für das Tissue Engineering. Daher wurde das Vogelei als Testsystem in dieser Arbeit gewählt. Um Gewebe- und Zellkulturexperimente durchführen zu können sowie die Funktionsweise des Bioreaktors Vogelei besser zu verstehen, musste zunächst eine umfangreiche technische Entwicklung und Evaluation durchgeführt werden, damit der sich entwickelnde Embryo in ausreichender Qualität kultiviert, dokumentiert und manipuliert werden kann. Dies ist in der geschlossenen und blickdichten Kalkschale nicht möglich.

Es wurde ein Kultivierungssystem entwickelt und evaluiert, welches die vollständige Embryogenese ermöglicht. Des Weiteren wurde ein ausschließlich aus künstlichen Materialien bestehendes Kultivierungssystem entwickelt, welches alle bekannten vergleichbaren Kultivierungssysteme sowohl in den Dokumentationsmöglichkeiten als auch in der maximal möglichen Kultivierbarkeit der Vogelembryonen deutlich übertrifft und eine vollständige Beobachtung des Embryos zulässt. Nach Auswertung der Leistungsparameter kommerziell erhältlicher Inkubatoren wurden zwei neuartige Inkubatoren entwickelt, aufgebaut und evaluiert, mit denen eine automatisierte Inkubation und Dokumentation der sich entwickelnden Embryonen möglich ist und die ein systematisches Arbeiten deutlich erleichtern.

Unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Werkzeuge und Protokolle zur Handhabung von Hühnerembryonen wurden experimentelle Daten zur Kultivierung von Säugerzellen und Geweben generiert. Nur mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten technischen Systemen war eine stabile Kultivierung der Hühnerembryonen und damit auch die Kultivierung von Fremdzellen, was als grundlegende Voraussetzung für das Tissue Engineering anzusehen ist, möglich. Das Schlüsselexperiment stellte der Anschluss eines Gewebes an das Blutgefäßsystem des Embryos dar. Hierzu musste zunächst einmal die Durchführbarkeit einer Zell- und Gewebekultur in-ovo nachgewiesen werden und die optimal dafür geeignete Position in ovo gefunden werden. Als optimal geeignet für die Kultivierung von Zellen und Geweben wurde die Chorionallantoismembran bewertet. Der Anschluss von Herzmuskelsphäroiden an das Blutgefäßsystem des Embryos konnte erstaunlicherweise auch ohne die Zuhilfenahme von Wachstumsfaktoren durchgeführt werden, was die grundlegende Möglichkeit zur Generierung von dreidimensionalen Geweben über die diffusionsbegrenzte Dicke hinaus für möglich erscheinen lässt.

Summary

In this work a new approach of generating functional tissues and organs with tissue engineering techniques was investigated. The generation of three-dimensional tissue is currently not possible. The reason therefor is the insufficient supply of the inner cells with oxygen and nutrients. The best way to solve this problem is the supply of the cells with a vascular system.

To evaluate this, a suitable test system is required. For the connection of a tissue with a vascular system a test system has to allow the cultivation of that tissue and has to provide a vascular system. The developing chicken embryo has a proliferative vascular system and all the signs are that it is possible to perform cell and tissue culture in it. This is the reason why the chicken embryo was chosen for the experiments in this work. For cell culture experiments an extensive technical development and evaluation had to be done to allow high quality documentation and manipulation which was not possible in the closed and opaque eggshell. A cultivation system was developed and evaluated which allows the whole embryogenesis to take place. Furthermore a completely artificial cultivation system which outnumbers all known systems of that kind concerning documentation quality and maximum survival of the embryos by far was successfully implemented. After evaluating the available incubators two completely new incubators were build up and successfully tested on automated incubation and documentation. Those new incubators facilitated a systematic investigation in this thesis.

Using the newly generated tools for the handling of the chicken embryo experimental data concerning the cultivation of cells and tissue in ovo were generated. Only with those new systems a stable embryo culture was possible and with that the cultivation of foreign cells. The key experiment was considered the connection of a tissue to the vascular system of the embryo. Therefor the possibility to perform cell and tissue culture as well as the optimal spot in ovo had to be found. As an optimal spot the chorioallantoic membrane was identified. The connection of heart muscle spheroids to the vascular system of the chicken embryo was successfully performed without any growth factor what makes it look possible to generate three dimensional tissues with that technique.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(v/v)	Volumen/Volumen (engl. volume to volume)
(w/v)	Gewicht/Volumen (engl. weight to volume)
(w/w)	Gewicht/Gewicht (engl. weight to weight)
AKD	Alkylierte Diketene
BrdU	5-Bromdesoxyuridin
CAM	Chorionallantoismembran
CHO	Ovariums Zellen des chinesischen Hamsters (engl. Chinese hamster ovarium cells)
CHS	CHO-GFP-Sphäroide
CMS	CHO-Herzmuskelsphäroide
DAPI	4,6-Diamin-2-phenylaminindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EM	Elektronenmikroskop
FDA	Fluoreszeindiazetat
FKS	Fötale Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HET-CAM	Hühnerei Test auf der Chorionallantoismembran (engl. hen's egg test on chorionallantoic membrane)
HH	Hamburger-Hamilton-Stadium
HMS	Herzmuskelsphäroide
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen (engl. human mesenchymal stem cells)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxantin
ITO	Indium-Zinn-Oxid (engl. Indium tin oxyde)
L/T	Lebend-Tod-Färbung
MEM	Minimal essentielles Medium
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. phosphatebuffered saline)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI	Propidiumiodid
PTFE	Polytetrafluoräthylen
RH	Relative Luftfeuchtigkeit (engl. relative humidity)
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
VM	Vitellinmembran
WST	wasserlösliches Tetrazoliumsalz (engl. water soluble tetrazoliumsalt)

1 Einleitung

In der Transplantationsmedizin spielt die Versorgung mit Spenderorganen und Spendergeweben eine zentrale Rolle. Aus den verschiedensten Gründen, wie etwa Verletzung oder Krankheit, entstehen Situationen, in denen Menschen auf Spenderorgane und Spendergewebe angewiesen sind. Probleme bei der Behandlung solcher Situationen ergeben sich schon seit längerem nicht mehr aus der Operationstechnik oder der immunologischen Akzeptanz transplantiertes Gewebe. Für fast jedes Organsystem existieren funktionierende Transplantationsprotokolle. Abstoßungsreaktionen können durch Vorauswahl des Spendermaterials und Immunsuppression minimiert werden. Vielmehr herrscht ein allgemeiner Mangel an geeigneten Organen und Geweben zur Transplantation. Durch Spender allein kann der Bedarf trotz umfangreicher Programme zur Förderung der Spendenbereitschaft auch in Zukunft nicht gedeckt werden. Um die Kluft zwischen Angebot und Nachfrage zu schließen, wird auf dem Feld des Tissue Engineerings und der Regenerativen Medizin an Lösungen für dieses Problem gearbeitet.

Tissue Engineering beschreibt die In-vitro-Erzeugung von biologischen Geweben und Organen durch gerichtete Kultivierung und Differenzierung von Zellen, die z.B. durch Stütz- und Gerüststrukturen in eine gewünschte Form gebracht werden kann. Die Regenerative Medizin beschäftigt sich mit der Heilung verschiedener Erkrankungen durch biologischen Ersatz und Anregung der natürlichen Heilungsprozesse mittels Stammzellen. Die beiden Disziplinen überschneiden und ergänzen sich gegenseitig. Dennoch ist der Fortschritt des Tissue Engineerings bis auf wenige Ausnahmen bislang noch weit hinter den gestellten Erwartungen zurück geblieben.

1.1 Aufgabenstellung

Nur in wenigen Ansätzen des Tissue Engineerings wird die Versorgung der generierten Gewebe über ein Gefäßsystem berücksichtigt. Entweder ist man technisch noch nicht so weit fortgeschritten, dass dieses Problem angegangen werden kann oder man kämpft

mit dringenderen Problemen, wie der Immuntoleranz. Der Ansatzpunkt dieser Arbeit liegt bei der Betrachtung der natürlichen Entstehung von Organen, der Embryogenese. Aus der Menge der unterschiedlichen Modellsysteme der Embryogenese erscheint die Embryologie der Vögel als am vielversprechendsten.

Die Entwicklung der Vögel verläuft in einem extrakorporal inkubierten Ei. Das Vogelei entspricht in seinen Eigenschaften geradezu einem technischen Inkubator. Das, was im Tissue Engineering erreicht werden soll, nämlich die Generierung von funktionsfähigen, großen Organen, läuft unter Induktion von Vaskulogenese und Angiogenese im Vogelei in perfekter Form ab. Somit könnte das Vogelei gut als Vorbild für einen technischen Inkubator für das Tissue Engineering dienen. Das Vogelei ist vom Mutterorganismus abgelöst und bedarf zur Entwicklung lediglich einiger physikalischer Parameter. Es müssen nur Wärme, Bewegung und ein Gasaustausch sichergestellt werden, um die Entwicklung des Embryos zu starten und aufrecht zu erhalten.

Die Hypothese dieser Arbeit besagt demnach, dass das Vogelei ein Vorbild für ein technisches Kultursystem für das Tissue Engineering zur Produktion von Organen darstellt. Es muss systematisch technisiert werden, um es in all seinen Komponenten zu verstehen. Außerdem ist es zwingend notwendig das Vogelei für die Nutzung im Tissue Engineering zugänglich und technisch beherrschbar zu machen. Um die durchzuführenden Modifikationen und Manipulationen auf ihre Auswirkungen auf die Grundeigenschaften des Eies beurteilen zu können, wird ein Test benötigt. Der Test, der hier als geeignet erachtet wird, ist der vollständige Ablauf der embryonalen Entwicklung und der Schlupf des Küchens.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Generierung von Geweben mit Gefäßsystem in dem Vogelei ähnlichen Kulturen. Die Vision, die den Rahmen dieser Arbeit aber übersteigt, ist die Generierung von funktionalen Organen auf diesem Wege. Um dieses Ziel zu erreichen, werden zwei Wege verfolgt:

1. Die schrittweise Technisierung aller Komponenten des Vogeleies zur Schaffung eines vollständig artifiziellen In-vitro-Kultursystems
2. Die Einbringung, Kultivierung und Anbindung an ein Blutgefäßsystem von Säugetierzellen und Säugetiergeweben in das Ei, mit und ohne Embryo.

Am Schlupf der Küken soll getestet werden, ob die durchgeführten Veränderungen nicht die Grundeigenschaft des Eies beeinträchtigt haben. Die Arbeit hat dadurch eine Trennung in einen technischen Teil mit intensiven Entwicklungs- und Evaluations-Experimenten und einen biologischen Teil mit umfangreichen In vitro sowie in vivo Kultur-Experimenten.

1.2 Tissue Engineering

Der Wunsch Verletzungen, Missbildungen oder den Verlust von Organen, Geweben und Gliedmaßen zu korrigieren, ist so alt wie die Medizin selbst. Eine frühe Darstellung dieser Vision findet sich in der griechischen Sage über die Bestrafung des Prometheus. Dieser wurde an einen Felsen gekettet und täglich von einem Adler aufgesucht, der ihm die Leber herausriss und die sich täglich neu bildete. Bemerkenswert an dieser Darstellung ist, dass die Wahl der antiken Autoren gerade auf die Leber fiel, welche heute für ihre hohe Regenerationsfähigkeit bekannt ist. Ob die Auswahl auf medizinischen Erfahrungen beruhte, bleibt Spekulation. Bis zum heutigen Tag ist das erstrebenswerte Ziel der Herstellung funktionaler Organe, die durch eine Art Regeneration wie bei Prometheus als Ersatz dienen können, nicht erreicht. Bereits in der Antike wurden Gliedmaßen durch Repliken aus Holz, Metall oder Knochen ersetzt, um die betroffenen Patienten kosmetisch, wie auch in bedingtem Maße funktional, zu unterstützen [14]. Im 16. Jahrhundert wurden erste Versuche unternommen, Prothesen aus humanem Gewebe herzustellen, wie etwa Tagliacozzi von Bologna, der aus der Haut des Unterarmes eine Nasenprothese herstellte [56]. Ein großer Fortschritt bildete die Entwicklung der Transplantationsmedizin. Die erste erfolgreiche Organtransplantation am Menschen wurde 1954 durchgeführt [103]. Murray und Kollegen transplantierten dabei einem 23-jährigen Mann die Niere seines Zwillingbruders. Die erste erfolgreiche Nierentransplantation von genetisch unterschiedlichen Personen konnte Murray 1959 durchführen. Die Abstoßungsreaktion des Empfängers wurde hierbei durch den Einsatz von Röntgenstrahlung und Kortison unterdrückt. Bis heute wurden große Fortschritte im Bereich der Transplantationsmedizin erreicht, sodass es möglich ist, nahezu alle Organe zu transplantieren.

Trotz aller Bemühungen klafft seit jeher eine inakzeptable Lücke zwischen dem Angebot und der Nachfrage von Spenderorganen. So standen 2013 im Zuständigkeitsbereich von Eurotransplant 10757 Patienten auf der Warteliste für eine Spenderniere. Im gleichen Zeitraum konnten aber nur 1682 Spenderorgane bereitgestellt werden [36]. Auch auf längere Sicht ist, auf Grund der demographischen Entwicklung und der begrenzten Bereitschaft der Bevölkerung zur Organspende, keine Besserung dieser Situation zu erwarten. Aus dieser Sachlage heraus haben sich die Bereiche des Tissue Engineerings und der Regenerativen Medizin entwickelt.

Ziel dieser Forschungsgebiete ist es, durch die Kombination von Zell- und Gewebekultur mit Materialbearbeitungstechniken Ersatz für geschädigte und zerstörte Gewebe und Organe *in vitro* zu generieren, um diese dann zu implantieren. Das Tissue Engineering bietet gegenüber der Organtransplantation den Vorteil, dass durch die Nutzung autologer, also körpereigener Zellen, eine Immunreaktion vermieden wird, wodurch folgerichtig auch die mit Nebenwirkungen verbundene Immunsuppression entfallen kann. Der Organspender würde durch die Nutzung autolog gewonnener Zellen und Gewebe seine Stellung als einzige Quelle von Geweben für Transplantationen verlieren und eine unbegrenzte Anzahl an Transplantaten wäre verfügbar. Dies ist der große Vorteil, den das Tissue Engineering gegenüber allen alternativen Ansätzen bietet und weswegen es auch als zielführend und erfolgsversprechend gilt.

Das große Ziel des Tissue Engineerings ist die Erzeugung eines kompletten Organs *in vitro*, das in seiner Struktur und Funktion dem im Körper gewachsenen gleicht. Im Zuge der Diskussion um das Tissue Engineering werden die Begriffe Gewebe und Organ oft vermischt. Die Begriffe sollen daher kurz erläutert werden, um die Erfolge des Tissue Engineerings besser einordnen zu können. Ein Gewebe besteht aus einem oder wenigen Zelltypen, ist von einfacher Struktur und nimmt nicht überlebenswichtige Aufgaben wahr. Ein Organ besteht immer aus mehreren Zelltypen, weist eine komplexe Struktur auf und nimmt meistens überlebenswichtige Funktionen wahr.

Es werden mehrere Ansätze zur Bereitstellung von Organen auch außerhalb von Tissue Engineering verfolgt, die im Folgenden kurz diskutiert werden sollen, um die Problematik des Themenfeldes zu beleuchten:

I. Nutzung von Organen anderer Spezies als Xenotransplantate

Die Erhöhung der Anzahl verfügbarer Ersatzorgane, in dem man speziesfremde Organe nutzt, ist ein Ansatz, der eine rasche Lösung des Problems verspricht. Die Verfügbarkeit von tierischen Organen zur Deckung des Transplantationsbedarfes wäre in Bezug auf die benötigte Menge durchaus denkbar. Durch die Notwendigkeit, z.B. einer sterilen Tierhaltung wäre damit allerdings ein hoher finanzieller Aufwand verbunden. Insbesondere über die Nutzung von Schweineorganen wurde in den vergangenen Jahren vermehrt publiziert [28, 25]. Obwohl Primaten mit dem Menschen genetisch näher verwandt sind, hat sich das Schwein als besser geeigneter Spender für Xenotransplantate, insbesondere des Herzens, erwiesen. Die Transplantation des Herzens eines Pavians in den Körper eines Neugeborenen mit hypoplastischem Linksherzsyndrom löste Mitte der 1980er Jahre nach dem Tod des Säuglings eine bis heute andauernde Diskussion über Xenotransplantate aus [8]. Anders verhält es sich mit Gewebeteilen für Transplantationszwecke. Die Transplantation von Schweineherzklappen wird nach einer Behandlung, bei der sämtliche antigenträgenden Zellen entfernt werden, erfolgreich durchgeführt. Die so behandelten Herzklappen werden als brauchbare Alternative zu künstlichen Herzklappen angesehen [15]. Das größte Problem der Xenotransplantate stellt die Immunreaktion des Empfängers dar. Diese fällt bei Xenotransplantaten, verglichen mit Allotransplantaten (Transplantat von nicht genetisch identischen Spendern derselben Art), deutlich stärker aus. Die Nutzung starker Immunsuppressiva, die nötig ist, um die Abstoßungsreaktion zu unterdrücken, bildet, durch die ständige Gefahr von Infektionen, einen schweren Eingriff in die Lebensqualität der Patienten. Des Weiteren besteht bei der Nutzung von Xenotransplantaten die Gefahr der Übertragung infektiöser Keime vom Tier auf den Menschen. Auch ungeklärte ethisch-rechtliche Bedenken stehen im Raum und bilden Hemmnisse für die klinische Nutzung [3]. Der ursprünglich vielversprechende Ansatz ist bis heute noch wenig fortgeschritten.

II Anregung der Selbstregenerationsfähigkeit des geschädigten Organismus

Das Vorbild dieses Lösungsansatzes bietet die Natur selbst. Vom mexikanischen Schwanzlurch Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) und anderen Amphibien ist bekannt, dass verlorene Gliedmaßen innerhalb von wenigen Tagen regeneriert werden [22, 68].

Diese bemerkenswerte Fähigkeit erstaunt Menschen seit jeher und regt ihre Fantasie an. Diese Fähigkeit zur Regeneration wird auch im genetischen Erbe des Menschen, allerdings blockiert, vermutet. Eine solche Regeneration anzuregen, um Organe und Gewebe wiederherzustellen, ist das Ziel dieses Ansatzes. Dies könnte jedoch ausschließlich durch genetische Manipulationen erfolgen. Zunächst einmal gilt es, die Prinzipien der Regeneration zu verstehen. Versuche finden auf Ebene der Versuchstiere, wie z.B. Drosophila (*Drosophila melanogaster*) und Zebrafisch (*Danio rerio*), statt. Der größte Anteil der Forschergruppen auf diesem Feld verfolgt die Regeneration von Nervensträngen zur Heilung von unfallbedingten Lähmungen [93]. Die Regeneration von vollständigen Organen beim Menschen mit diesem Ansatz scheint noch in weiter Ferne zu liegen. Als kritisch werden ungeklärte ethische und rechtliche Aspekte wegen der notwendigen genetischen Manipulationen angesehen.

III Erzeugung von künstlichen Hybridimplantaten

Hybridimplantate ersetzen nicht das vollständige Organ, sondern nur dessen physiologische Funktion. In den meisten Fällen handelt es sich um biologisch/technische Schnittstellen, die als Implantate zu betrachten sind. Ein Beispiel hierfür ist die Nutzung von Leberzellen in einem Bioreaktor, welche der physiologische Funktion der Leber, analog der Dialyse, entsprechen [42, 9]. Dieses System der extrakorporalen Leber findet auch in anderen Feldern wie der Arzneimittelanalyse als Testsystem Anwendung [109]. Sehr gut arbeiten z.B. Herzunterstützungssysteme, die wesentlich besser als komplett künstliche Herzen funktionieren. Solche Ansätze scheinen in ihrer Funktion relativ zuverlässig zu sein, stellen aber selten eine Dauerlösung dar. Die Schnittstelle zum Patienten ist noch weit von dem entfernt, was man als vollwertigen Ersatz eines Organes bezeichnen kann. Als Brückenlösung sind diese Hybridsysteme sehr wertvoll und haben ihre klinische Anwendung gefunden. Mit dem Ziel die Funktion verlorengangener Organe dauerhaft und ohne Einschränkungen wiederherzustellen, sind diese Systeme momentan nicht vereinbar.

IV Bewachsen eines künstlichen Gerüsts mit Zellen

Dieser weit verbreitete Ansatz nutzt natürliche, vor allem aber künstlich erzeugte Gerüststrukturen, so genannte Scaffolds, als Wachstumsgrundlage von biologischen Material. Die meisten Anwendungen des Tissue Engineerings beruhen auf dieser

Technik. Auf den geometrisch vorgeformten und biokompatiblen Strukturen sollen die Zellen eine Orientierung erhalten und die gewünschte Form bilden. Ein Beispiel für diesen Ansatz ist die in der Presse als „Ohrmaus“ (Abbildung 1) bezeichnete Arbeit [21]. In dieser Studie wurde ein Polymerscaffold unter die Haut von Nacktmäusen gebracht und zusammen mit Chondrozyten kultiviert. Ein weiteres Beispiel ist die künstliche Haut Integra[®]. Hier dient eine Proteinmatrix als Substrat für die Besiedelung mit Zellen. Das Material wurde bereits 1981 von Burke beschrieben und zählt heute zu den am besten untersuchten Tissue Engineering Produkten, das auch in der Klinik zur Behandlung großflächiger Verbrennungen eingesetzt wird [18]. Hierbei dient das Material zunächst als Wundabdeckung und wird schrittweise von den körpereigenen Zellen bewachsen und degradiert. Klinische Erfolge konnten auch mit Knorpelgewebe auf Hyaluronsäurebasis erzielt werden [65]. Dieser Ansatz zeigt die besten Ergebnisse und den weitesten Fortschritt. Er findet an vielen verschiedenen Organ- und Gewebesystemen wie etwa Muskeln, Haut, Knorpel, Niere, Nerven und Leber Anwendung [56]. Die ersten Produkte, wie etwa die künstliche Haut, können als einfache Organe bezeichnet werden und sind bereits im klinischen Einsatz. Die Erzeugung großer dreidimensionaler Gewebe und Organe mit diesem Ansatz ist bisher nicht gelungen.

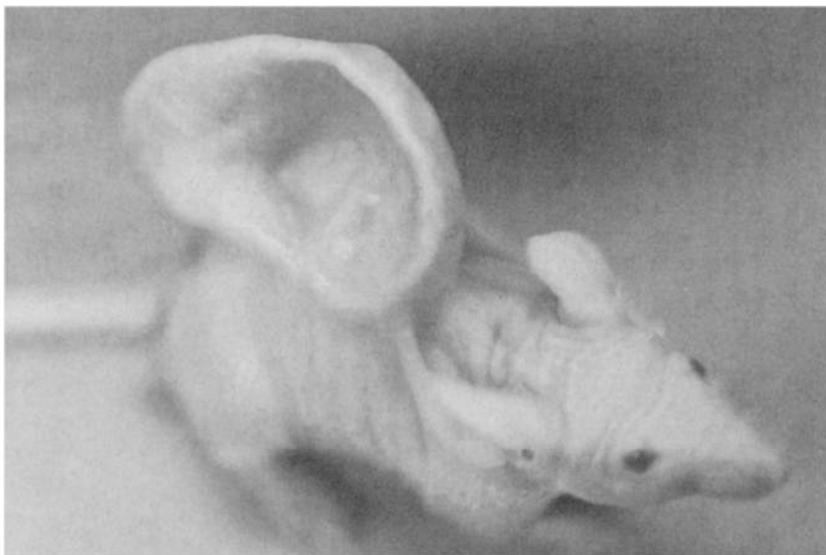


Abbildung 1: Mit Chondrozyten besiedeltes und unter die Haut einer Maus transplantiertes Polymergerüst in Form einer menschlichen Ohrmuschel [21]

V Dezellularisierung und anschließende Wiederbesiedlung von Organen mit Zellen

Die Nutzung der natürlich gewachsenen zellfreien Proteinmatrix von Organen steht im Zentrum dieses Ansatzes. Die Organe werden in einem Perfusionsverfahren von sämtlichen Zellen befreit, wobei nur die extrazelluläre Matrix übrig bleibt. Dieser Prozess ist für viele Organe, wie z.B. dem Herz, beschrieben [44, 47, 26]. Anschließend soll die Neubesiedelung mit Zellen des Patienten zur Wiederherstellung der physiologischen Funktion führen. Am Herz der Ratte (*Rattus norvegicus*) wurde dieser Prozess durchgeführt und mit Herzmuskel- sowie Endothelzellen soll eine Neubesiedelung der Proteinmatrix erreicht (Abbildung 2). Eindrucksvoll konnte dabei eine makroskopische Kontraktion des Konstrukts gezeigt werden [80]. Weitere Anwendungen findet der Ansatz bei anderen Organsystemen, wie z.B. der Lunge [83]. Hier werden aktuell methodische und materialtechnische Versuche zur Optimierung des Dezellularisierungs- und Wiederbesiedlungsprozesses durchgeführt. Eine Nutzung im lebenden Organismus wurde noch nicht beschrieben.

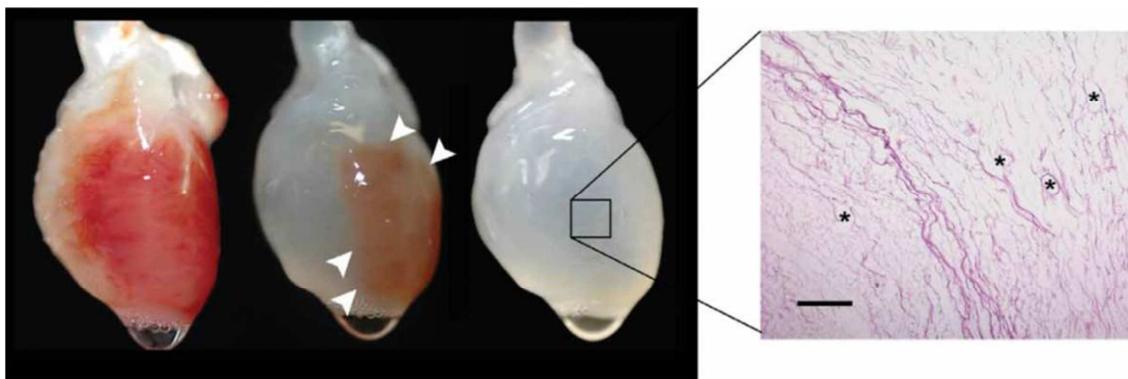


Abbildung 2: Dezellularisierung eines Rattenherzens. Links: Schrittweise Dezellularisierung eines Rattenherzens mittels Perfusionsverfahren zur nachfolgenden Neubesiedlung mit Zellen. Rechts: Gewebeschnitt mit H/E-Färbung des vollständig dezellularisierten Gewebes, Balken entspricht 200 µm [80]

Bei den mit diesem Ansatz erzeugten Geweben handelt es sich um dünne und einfache Strukturen. Obwohl eine beeindruckende Leistung, zeigte das neu besiedelte Herz, verglichen zum gewachsenen Herzen, gerade einmal eine Pumpleistung von 2 % [80]. Damit ist es weit von dem entfernt, was das natürlich gewachsene Herz leistet und ein

In-vitro-Herz zu leisten im Stande sein muss. Die Koordination der Kontraktion sowie die Öffnung der Herzklappen bildet den nächsten Schritt, den es zu beherrschen gilt, um die Leistung zu erhöhen. Dazu bedarf es der räumlichen Platzierung verschiedener Zellen. Für komplexe Organsysteme mit physiologischer Leistung scheint die Technik noch nicht weit genug fortgeschritten zu sein.

VI Aufbau von Strukturen aus einzelnen Zellen

Die räumliche Positionierung einzelner Zellen wird im sogenannten Bioprinting durchgeführt. Die Erzeugung einer Geometrie ohne strukturgebende Komponente würde die Frage des Verbleibs der Stützstruktur im Körper klären. Diese neue Technik ermöglicht die freie Festlegung des Platzes der Zellen in einem dreidimensionalen Konstrukt. Boland et. al. beschreiben einen Prozess, in dem sie ein thermosensitives Gel zur Auftragung der Zellen nutzen, um deren räumlichen Platz einzugrenzen [16]. Die Erzeugung von Mikrogeweben, die als Bausteine für größere Organ- und Gewebekonstrukte dienen sollen, wurde von Mironov beschrieben [71]. Beim Zusammensetzen von vielen kleinen Untereinheiten wird hierbei auf eine dirigierte Selbstorganisation der Mikrogewebe verwiesen. Die Erzeugung von Gefäßen ist momentan eines der Hauptanwendungsfelder dieser Technik [2]. Ebenso wurde die Erzeugung von humaner Haut (Abbildung 3) mit Bioprinting beschrieben [59]. Für die Generierung komplexer Formen mit Bioprinting, die über die Geometrie von Röhren und Blätter hinausgehen wurden bisher keine Veröffentlichungen gefunden.

Aktuell ist dieses Verfahren noch sehr weit von einer klinischen Anwendung entfernt, da vor allem technische Probleme ungelöst sind. Besonders zwei Parameter, die als kritisch anzusehen sind, gilt es im Auge zu behalten: die räumliche Auflösung und die Zeit. In der Auflösung liegt die aktuelle Begrenzung zur Anfertigung feiner und feinsten Strukturen. So ist es aktuell nicht möglich, Gefäße auf Kapillarebene herzustellen.

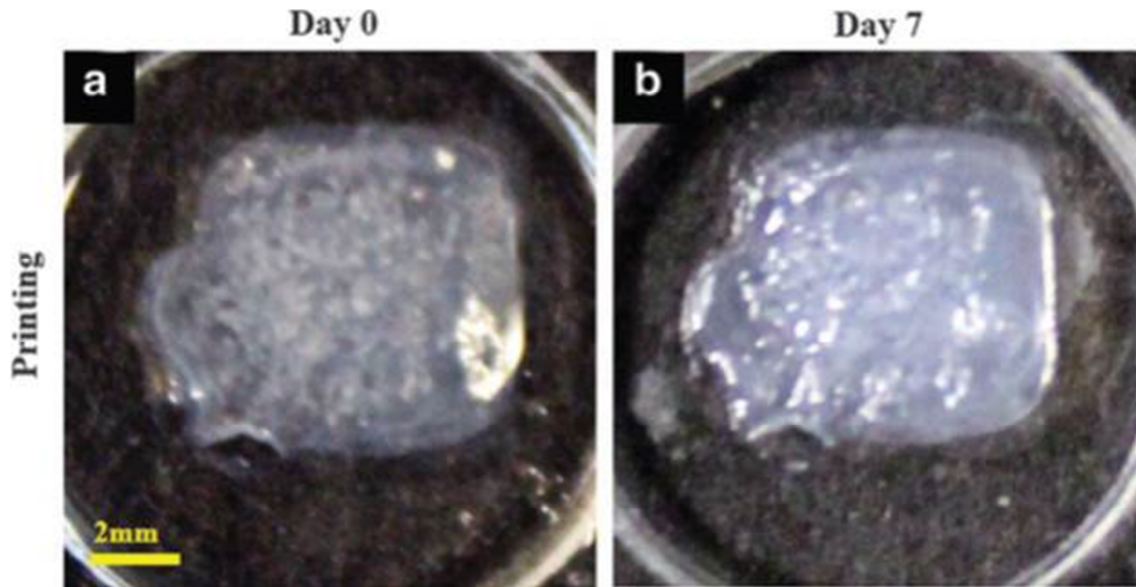


Abbildung 3: Durch Bioprinting erzeugte künstliche Haut. Gezeigtes Material wurde schichtweise aus Kollagen, Keratinozyten und Fibroblasten aufgebaut [59]

Eine kurze Abschätzung soll die Frage des zeitlichen Aspekts näher beleuchten: Der durchschnittliche Mensch (85 kg) besteht aus etwa 10^{14} Zellen [95]. Heruntergerechnet auf ein Organ wie das Herz (300 g) ergibt sich eine Zellzahl von $3,529 \cdot 10^{12}$ Zellen, welche es für die Generierung eines "gedruckten Herzens" zu positionieren gilt. Geht man von nur einer Zellsorte aus und einer angenommenen Positionierungsgeschwindigkeit von 1000 Zellen pro Sekunde (Geschwindigkeit eines modernen FACS-Gerätes), so würde die Positionierung aller $3,529 \cdot 10^{12}$ Zellen über 111 Jahre dauern. Nimmt man für die Zeit, die man die Zellen im unfertigen Organ vital erhalten kann mit 48 Stunden an, so wäre es möglich in dieser Zeit $1,73 \cdot 10^5$ Zellen zu positionieren. Dies entspräche einem Gewebe mit einem Gewicht von 0,014 Milligramm. Natürlich würden sich diese Zahlen durch technische Parallelisierungen und Verfeinerungen der Abläufe noch optimieren lassen, doch zeigt diese Abschätzung deutlich die Problematik der Methode. Der Einfachheit halber wurde die Tatsache vernachlässigt, dass die Zellen im Körper nicht gleichmäßig verteilt vorliegen. Das Drucken von Geweben in für das Tissue Engineering verwertbarer Größe scheint demnach momentan nur für kleine oder flache Gewebe möglich.

Die Auflistung der Ansätze des Tissue Engineerings zeigt, dass mit flachen zweidimensionalen Strukturen bereits erste klinisch verwendbare Produkte entwickelt

wurden. Der Schritt von einfachen zweidimensionalen Geweben hin zu komplexeren dreidimensionalen Organen ist jedoch noch nicht möglich. Bei näherer Betrachtung handelt es sich bei den klinisch relevanten Produkten des Tissue Engineerings insgesamt um diffusionsbasierte Gewebe, deren Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über Diffusion aus dem umliegenden Nährmedium erfolgt. Fast alle Ansätze vernachlässigen bisher die biologisch physikalischen Limitationen eines kompakten Gewebes.

Im Dezember 2013 wurde der New Organ Preis gestiftet. Dieser durch Spenden finanzierte Preis hat den Zweck die Entwicklung eines funktionsfähigen In-vitro-Organs zu fördern. Der Preis ist aktuell mit 1 Million US\$ dotiert und untermauert die Aktualität und Bedeutung des Themas in der heutigen Forschung [69]. Die Anwendungen, welche derzeit den Kliniken zur Verfügung stehen, zeichnen sich durch ihre recht einfache Struktur aus. In fast allen Fällen bilden die Gewebe dünne Schichtsysteme von wenigen Millimetern Dicke, Knorpelimplantate bilden hier eine Ausnahme [39]. Die Begründung hierfür mag im geringen Sauerstoffbedarf der Chondrozyten liegen.

Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Entsorgung von Abfallstoffen und Kohlendioxid erscheint die größte Hürde für die Entwicklung von echten makroskopischen dreidimensionalen Geweben zu sein. Im Körper, genauso wie in der In-vitro-Kultur, ist derzeit die Versorgung der Zellen nur über Diffusion möglich. Die Versorgung von Zellen über Diffusion funktioniert allerdings nur über kurze Entfernungen, da mit zunehmender Diffusionsstrecke die Zeit zum limitierenden Faktor wird. Bereits 1923 stellte Warburg bei Tumoren nekrotische Kerne fest, die er auf die Unterversorgung mit Nährstoffen zurückführte [106]. Diese von Warburg getroffene Beobachtung wurde später vielfach bestätigt, z.B. durch Sutherland mit Sphäroiden aus Kolonkarzinomzellen [98]. Erreichten die Sphäroide einen Durchmesser > 1 mm (Radius > 500 μm) bildet sich ein nekrotischer Kern im Inneren des Sphäroids an der Stelle, an der die unterversorgten Zellen abstarben. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die maximal mögliche Dicke von Geweben in vitro unter dem Wert von 1 mm zurück bleibt [66]. Dies liegt zum einen wohl an den unterschiedlichen Bedürfnissen verschiedener Zellen und zum anderen am unterschiedlichen Diffusionsverhalten von verschiedenen Nährstoffen, die von vielen Faktoren wie z.B. Konzentrationsunterschieden abhängen. In vivo sind die meisten Zellen nicht weiter als

100 μm von der nächsten Kapillare entfernt. Somit ist sichergestellt, dass eine ausreichende Versorgung der Zellen gewährleistet ist. Eine Ausnahme hiervon bilden die Chondrozyten des Knorpels, die in vivo in Entfernungen von Blutgefäßen $>100 \mu\text{m}$ überleben können [105]. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den erwähnten Erfolgen mit Chondrozyten im Tissue Engineering.

Um das Tissue Engineering von der Zweidimensionalität in die Dreidimensionalität der komplexeren Organ- und Gewebesysteme zu bringen, ist es folglich notwendig, die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen. In Geweben dicker als 100 μm kann das nur über ein funktionales Gefäßsystem erfolgen. Der Anschluss dieser Gewebe an ein Gefäßsystem und dessen Durchwachsen mit Blutgefäßen wird daher als essentiell angesehen. Diese grundlegende Voraussetzung wurde bisher im Tissue Engineering nicht berücksichtigt. Dies wird als der Grund dafür angenommen, dass bisher keine funktionalen makroskopischen 3D-Gewebe generiert werden konnten. Ein Anschluss von Geweben an ein Blutgefäßsystem kann über zwei Mechanismen erfolgen: die Vaskulogenese und die Angiogenese. Die Blutgefäße bei der Vaskulogenese entstehen aus endothelialen Vorläuferzellen, wohingegen die Blutgefäße bei der Angiogenese durch Sprossung oder Einstülpung bereits vorhandener Kapillaren entstehen [50, 87]. Zusätzlich ist eine Pumpe notwendig, die den Kreislauf aufrechterhält.

1.3 Das Vogelei als „natürlicher Bioreaktor“

Das Vogelei in seiner heutigen Ausprägung ist das Resultat von etwa 150 Millionen Jahren evolutionärer Selektion. Ausgehend vom Urvogel *Archaeopteryx*, der vor 150 Millionen Jahren lebte, bis zu den modernen Vögeln hat sich das Ei als Erfolgsmodell herausgestellt [67]. Es ist folglich davon auszugehen, dass jeder Bestandteil und jede Komponente eine eigene Funktion besitzt, die sich in ihrem Aufbau und ihrer Materialeigenschaft widerspiegelt. Die Natur hat Vogeleier in einer hohen Variation an Formen und Größen hervorgebracht. Von einer Brutdauer, die von nur 9 (Brillenvogel, *Zoeter opscoerulescens*) bis zu 80 Tagen (Emuartigen, *Dromaeide*) betragen kann sowie einer Gewichtsspanne, die von 0,57 g (Breitschwanzkolibri, *Selasphorus platycercus*) bis 1700 g (Afrikanischer Strauß, *Struthio camelus*) reicht [13]. Die größten

nachgewiesenen Vogeleier stammen von dem im 17. Jahrhundert ausgestorbenen Elefantenvogel (*Aepyornis maximus*). Sie waren ca. 30 cm hoch und an ihrer breitesten Stelle 22 cm im Durchmesser [72]. Diese Eier waren damit nicht deutlich größer als die größten Eier noch lebender Vögel (Straußenvögel). Auch die Eier von Dinosauriern waren, obwohl Dinosaurier im Vergleich zu Vögeln riesige Ausmaße annahmen, nicht wesentlich größer [23]. Es erscheint durchaus möglich, dass größere Eier nicht stabil genug sind, um die Belastungen während der Eiablage unbeschadet zu überstehen.

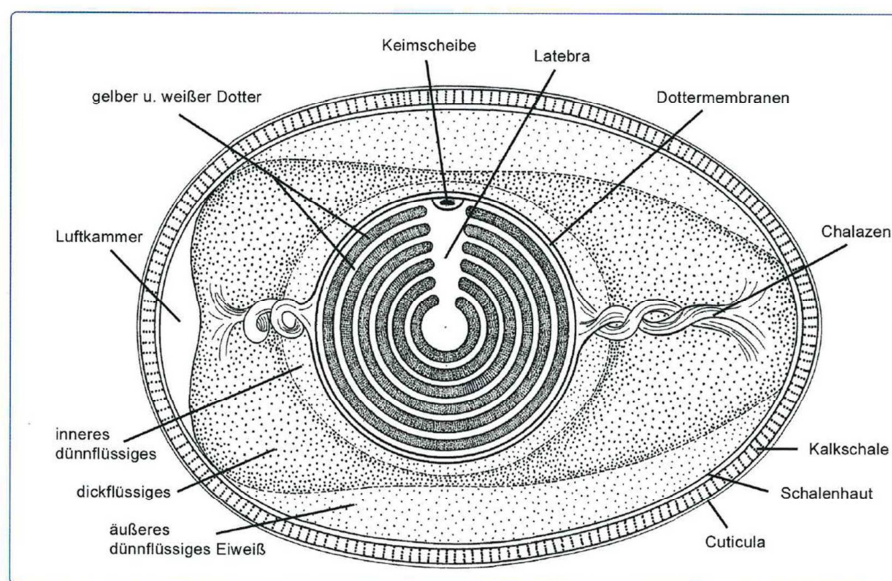


Abbildung 4: Der Aufbau des befruchteten Hühnereies zum Zeitpunkt der Eiablage. Zentral liegt der Dotter welcher von der Vitellinmembran (VM) umschlossen ist. Auf der Grenze zwischen VM und Dotter befindet sich der Keimscheibe. Zwischen den Schalenmembranen und der VM befinden sich die vier Schichten des Eiklars. Auf der Innenseite der Schale haften die beiden Schalenmembranen, zwischen denen sich am stumpfen Ende die Luftblase befindet. Nach Außen wird das Ei von der Kalkschale mit der aufliegenden Kutikula abgeschlossen [90]

Für die nähere Betrachtung des Vogeleies soll das Hühnerei (Abbildung 4) als Modell genutzt werden. Dies begründet sich darin, dass das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) in der Biologie, neben der Wachtel (*Coturnix coturnix*), den wichtigsten Modellorganismus für Vögel darstellt. Im europäischen Raum ist das Huhn zudem weiter verbreitet als die Wachtel.

Im Folgenden sollen die Komponenten des Eies aus Sicht eines In-vitro-Systems im Einzelnen beschrieben werden. Die Kutikula, Schale und Schalenmembranen

Einleitung

entsprechen zusammen dem Kulturgefäß, etwa einer Petrischale. Die äußere Grenze des Eies bildet die aus organischen Verbindungen bestehende Kutikula [24], welche den Schutz gegen Kontaminationen durch Mikroorganismen wahrnimmt und dem Verlust von Feuchtigkeit entgegenwirkt [104, 70]. Die 300 bis 400 μm dicke Eierschale besteht zu 97 % aus Kalziumkarbonat [19] und zeigt eine ausgeprägte Mikrostruktur [88, 94]. Das in der Schale enthaltene Kalzium wird während der Entwicklung des Embryos von Zellen der CAM gelöst und über das extraembryonale Blutgefäßsystem dem Embryo zugeführt, der es für den Knochenaufbau nutzt [97, 81].

In keinem In-vitro-Kultivierungssystem der Zellbiologie kommt es bisher zu einer derartigen Interaktion zwischen Behälter und kultiviertem Material. Die Kulturbehältnisse aus der In-vitro-Kultur sind für gewöhnlich inert und dienen durch ihre Form als Schutz vor Kontaminationen. Hier hingegen dient das Kulturgefäß zusätzlich als Speicher für Hilfsstoffe für die Embryonalentwicklung und ist somit ein wichtiger Bestandteil des Systems. Ob eine vollständige Entwicklung des Vogelembryos ohne diese Kalziumquelle möglich ist, kann aktuell nicht beantwortet werden. Diese Art von Wechselwirkung zwischen Behälter und zu kultivierendem Material könnte ein Grund für die effektive Arbeitsweise des Vogeleies sein. In nur 21 Tagen schlüpft aus einem 60 g schweren Ei ein 40 g schweres Küken und nur 20 g (33,3 %) gehen als Abfall verloren. Diese Reste werden allerdings wieder in den biologischen Stoffkreislauf aufgenommen, wie etwa die Kalkschale, die von den Hühnern gefressen und zum Aufbau neuer Eierschalen genutzt wird.

Tabelle 1: Dicken der einzelnen Komponenten des Hühnereies und deren Funktion

Kompartiment	Dicke	Quelle	Funktion
Kutikula	10-30 μm	[24]	Schutz vor Kontamination, Schutz vor Austrocknung
Kalkschale	300-400 μm	[19]	Mechanischer Schutz, Kalziumquelle, geregelter Gasaustausch
Äußere Schalenmembran	50-70 μm	[70]	Schutz vor Kontamination, Schutz vor Austrocknung
Innere Schalenmembran	15-26 μm	[70]	Schutz vor Kontamination, Schutz vor Austrocknung, biokompatible Begrenzung zu den inneren

			Eikomponenten
Vitellinmembran	10 µm	[70]	Kultursubstrat für den frühen Embryo, Abgrenzung Dotter und Eiklar
Eiklar	1-4 cm	Eigene Messung	Wasserversorgung, Ernährung, Schutz vor Kontamination, Positionierung des Embryos
Dotter	3-4cm	Eigene Messung	Ernährung, Positionierung des Embryos

Ein weiterer beachtenswerter Aspekt der Schale bilden 7000-17000 Poren. Über sie erfolgt der Gasaustausch, welcher für die Atmung des Embryos essentiell ist. Auch das ist ein gravierender Unterschied zu allen gegenwärtigen In-vitro-Systemen. Im Ei findet dieser Gasaustausch dem Entwicklungsfortschritt der Chorionallantoismembran (CAM) entsprechend auf der gesamten Oberfläche des Ellipsoids statt. In der In-vitro-Kultur erfolgt ein Gasaustausch im Gegensatz dazu über Grenzflächen, die anders als im Ei, nie über die gesamte Oberfläche für Gase durchgängig sind.

An der Innenseite der Schale verwachsen, finden sich die zwei Schalenmembranen, die zu 88 – 96 % aus Proteinen bestehen [58, 76] und eine weitere Barriere für eindringende Keime bilden [41]. Beide Membranen liegeneng aneinander an. Die Ausnahme bildet das stumpfe Ende des Eies, hier befindet sich zwischen den Membranen eine Luftblase. Obwohl das Eiklar nur zu 10 % aus Proteinen besteht (84-89 % Wasser) [60], trägt es, neben dem Dotter, ebenfalls zur Ernährung des Embryos bei [27]. Dotter und Eiklar werden durch die Vitellinmembran (VM) separiert. Sie bildet das Kultursubstrat der aus ca. 60000 Zellen (bei Eiablage) bestehenden Keimscheibe in der frühen Phase der Entwicklung [32]. In dieser Phase handelt es sich folglich beim Ei, rein technisch gesehen, um einen 2-Phasen-Flüssigkeitsinkubator mit einer frei schwimmenden Membran als Kultursubstrat [32]. Die embryonalen Zellen wachsen auf der hauptsächlich Proteinen bestehenden VM in direktem Kontakt zum Dotter [11, 102, 64]. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich die embryonale Entwicklung des Huhns mit der In-vitro-Kultur von Zellen vergleichen. Die Versorgung der Zellen erfolgt über Diffusion, was kein Problem darstellt, da die Zellen der Keimscheibe noch über Diffusion versorgt werden können. Später in der Entwicklung ist dies nicht mehr möglich und im Gegensatz zu dem Gewebe des TE schafft es der Embryo sein Wachstum fortzusetzen.

Einleitung

Im Ei wird über die Vaskularisierung das erreicht, was im In-vitro-System noch nicht möglich ist. Im späteren Verlauf der Entwicklung, ab Tag 3, ernährt sich der Embryo durch Nährstoffe, die von Zellen des Dottersacks aus dem Dotter gelöst und in den Blutkreislauf abgegeben werden. Der Dottersack bildet sich auf der Innenseite der VM, welche dann an Tag 4 aufgelöst wird [48]. Hier gelingt der Übergang der diffusionsbasierten Ernährung aus dem umgebenden Medium zu einer Ernährung aus dem Blutgefäßsystem.

Wegen all dieser speziellen und für das Tissue Engineering wichtig erscheinenden Eigenschaften wird das Ei in dieser Arbeit als ein sehr aussichtsreiches Modellsystem für das Tissue Engineering angesehen.

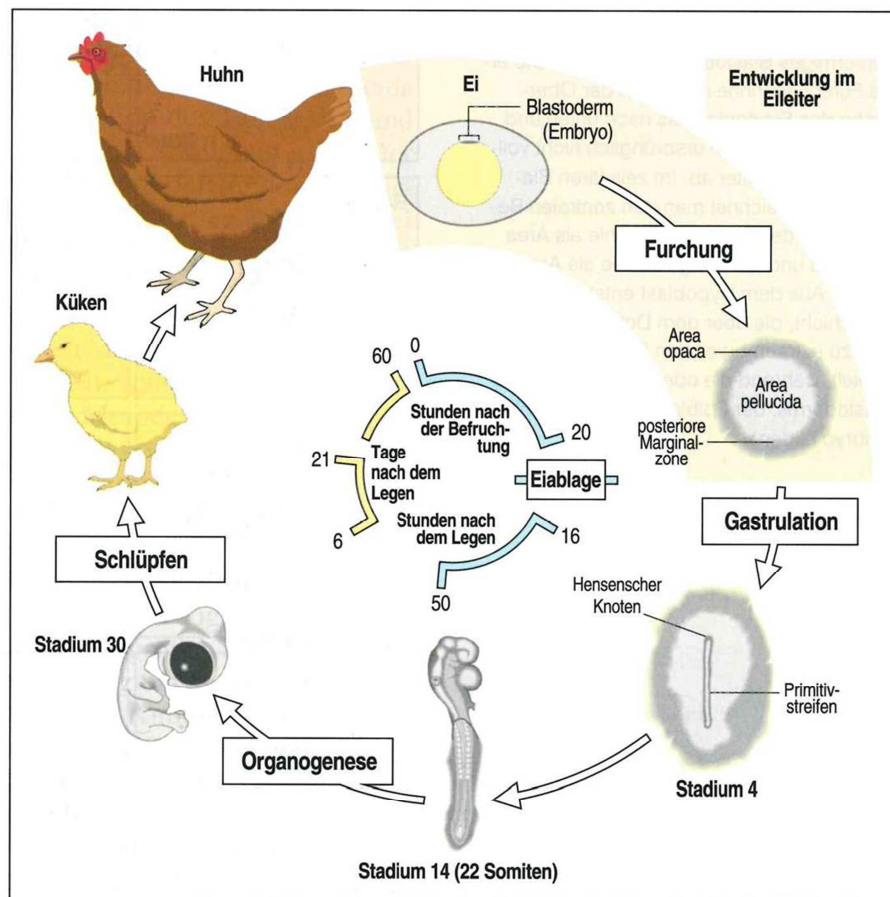


Abbildung 5: Lebenszyklus des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) mit Entwicklungsphasen im Muttertier (1 Tag), Entwicklung im Ei (21 Tage), juveniler und adulter Phase. Stadien der embryonalen Entwicklung von der Oviposition bis zum Schlupf nach Hamburger und Hamilton [45]. Abbildung nach Wolpert [107]

Angesichts der nicht stattfindenden Vaskularisierung und Angiogenese bisheriger in vivo-Ansätze stellt sich eine grundsätzliche Frage: Kann die Versorgung über Diffusion in der In-vitro-Kultur selbst ein Grund dafür sein, dass eine Umstellung der Versorgung nicht induziert wird? Dies scheint der Fall zu sein, denn will man ein Gewebe in die Größe wachsen lassen und erst dann feine Kapillaren und große Gefäße einfügen, so wird die bedarfsgerechte Platzierung, besonders der Kapillaren, schwierig. Der Aufbau des Gefäßbaumes in einem wachsenden Gewebe muss daher von Anfang an erfolgen. Ein passendes Bild liefert die Entwicklung von Verkehrswegen in neuen Siedlungen. Zunächst muss der Hauptverkehrsweg, über den eine neue Siedlung versorgt wird, angelegt werden. Wächst die Ansiedlung, muss der Hauptverkehrsweg ausgebaut werden, um den gestiegenen Waren/Verkehrsdurchsatz zu ermöglichen und Versorgungsengpässe zu verhindern. Je weiter das Wachstum geht, desto mehr kleine Anschlussstrecken und Verzweigungen für lokale Versorgungszentren müssen angelegt werden, um alle Bereiche der Siedlung versorgen zu können. So sollte auch im Tissue Engineering die Versorgung des entstehenden Gewebes über Blutgefäße erfolgen, die sich langsam, parallel und bedarfsgerecht entwickeln.

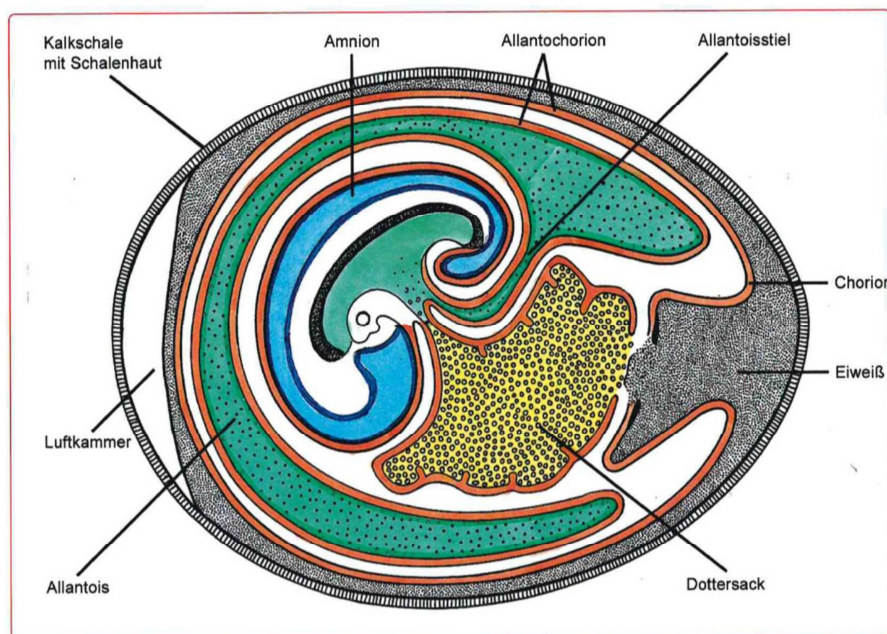


Abbildung 6: Der Hühnerembryo an Tag 10 der Bebrütung. Die Anlage von Geweben und Organen zu diesem Zeitpunkt ist bereits abgeschlossen. Die Chorionallantoismembran (CAM) umschließt die Eierschale zum großen Teil und dient dem Embryo zum Gasaustausch [90]

Von der VM quer durch das Eiklar bis zu den Schalenmembranen ziehen sich auf der Längsachse des Eies die zwei, auch Chalazae genannten, Hagelschnüre, welche die Rotation des Dotters im Ei ermöglichen [88]. Die Funktion der Chalazae wird beim Vergleich des Vogeleies mit dem Ei der Reptilien deutlich. In diesem fehlen die Hagelschnüre und ein Bewegen der Eier führt sehr schnell zu einer Schädigung des Embryos. Evolutionär ist dies sinnvoll, da Reptilieneier in der Regel nicht bebrütet werden und daher auch nicht bewegt werden müssen [29]. Die Funktion der Chalazae wird durch die Feinstruktur des Dotters unterstützt. Bei genauer Betrachtung finden sich zwei Arten von Dotter: der gelbe Nahrungsdotter und der weiße Bildungsdotter. Beide unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und ihrer physikalischen Dichte [12]. Unter dem Embryo bildet der weiße Dotter eine keulenförmige Struktur, die „Latebra“. Im restlichen Dotter finden sich, analog dem Aufbau einer Zwiebel, abwechselnde Schichten von weißem und gelbem Dotter. Technisch gesehen handelt es sich hier um eine Kompartimentierung, die dafür sorgt, dass der Embryo im Ei eine immer gleiche Position einnimmt. Es stellt sich die Frage, inwieweit die im Ei verwirklichte Lage für die Entwicklung des Embryos unveränderlich ist. Die räumliche Orientierung könnte folgerichtig auch für die Generierung von künstlichen Organen und Geweben wichtig sein.

Der innere Aufbau des Hühnereies ist von einer bemerkenswerten Kompartimentierung geprägt (Abbildung 6 und 7), die mit dem Fortschritt der Entwicklung des Embryos in ihrer Komplexität noch zunimmt. Neben der bereits angesprochenen Kompartimentierung des Dotters existieren vier extraembryonale Gewebe im Vogelei. Die räumliche Trennung von Stoffwechselprozessen und Substanzen ist für den komplexen Ablauf der Entwicklung scheinbar essentiell. Das Amnion entsteht durch die Faltung von Epiblastzellen um den Embryo am Ende der Neurulation (etwa 48 Stunden nach Beginn der Inkubation). Es bildet eine geschlossene Höhle um den Embryo, in welcher dieser in seinem Fruchtwasser vor Stößen geschützt heranwachsen kann. Neben dem Dottersack ist die Allantois das zweite vaskularisierte extraembryonale Kompartiment. Sie nimmt Oxidationswasser und andere Stoffwechselendprodukte des Embryos auf und entwickelt sich ab dem 2. Tag der Bebrütung. Eine weitere wichtige Funktion der Allantois ist der embryonale Gasaustausch. Ab dem 7. Inkubationstag

verwachsen die Allantois und das Chorion zur Chorionallantoismembran (CAM). Das Chorion ist das vierte extraembryonale Kompartiment und die äußerste embryonale Schicht, die sich der Schalenmembran anlagert. Die CAM umwächst schrittweise die komplette Innenseite der Eischale. An Tag 11 bedeckt sie 98 % der Eischaleninnenseite [7]. Im Ei scheinen die extraembryonalen Gewebe ihre Lage problemlos zu finden. Es ist ein interessanter Aspekt zu klären, ob eine Veränderung dieser Lage Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung hat.

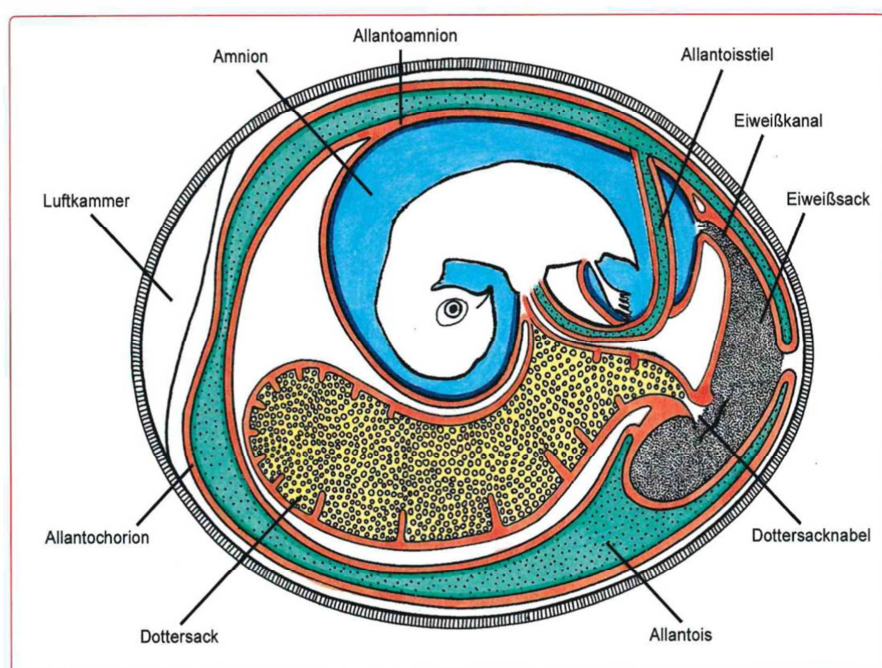


Abbildung 7: Der Hühnerembryos an Tag 14 der Bebrütung. Das Größenwachstum des Embryos hat begonnen, nachdem sämtliche Strukturen angelegt wurden. Der Embryo nimmt mehr als die Hälfte des Eihaltes ein [90]

Die Beeinflussung des Hühnerembryos im Ei durch externe Parameter, wie etwa Licht, erscheint sehr ausgeprägt. Bereits nach 72 Stunden Bebrütung haben sich im Ei ein schlagendes Herz und lichtensitive Augen entwickelt [74, 43]. Die Wahrnehmung der Beleuchtung äußert sich beim Hühnerembryo durch eine vermehrte Bewegung.

Eine Eigenschaft, deren Beeinflussung für die experimentelle Nutzung sehr interessant wäre, ist die Brutdauer. Diese liegt beim Hühner bei 21 Tagen (Abbildung 5). Wenn das Ei als Bioreaktor zur Generierung von Geweben eingesetzt werden kann, wäre es

hilfreich, die Brutdauer über einen physikalischen Umgebungsparameter zu variieren und vor allem verlängern zu können. Da der Embryo erst ab Tag 12 eigene Körperwärme produziert, wäre dies über die Inkubationstemperatur denkbar [46]. Ein weiterer Ansatz zur Variation der Brutdauer könnte in der Manipulation der Nährstoffversorgung liegen. Die Beobachtung zeigt, dass aus kleinen Eiern kleine und aus großen Eiern große Küken schlüpfen. Dies deutet auf eine einfache Regulierung des Wachstums hin, vermutlich über die Aufnahme der Nährstoffe über die Oberfläche des Zellsystems im Dottersack. Technisch wäre es z.B. vorstellbar, den Dotter an eine Mikrofluidik anzuschließen und den Dottersack mit weiterem Dotter zu füllen, um so einen quasi unerschöpflichen Nahrungsvorrat zu schaffen oder vorzutauschen.

Für den experimentellen Teil dieser Arbeit sind insbesondere die bereits erbrachten wissenschaftlichen Vorarbeiten von Interesse. Bereits seit der Antike wird das Ei des Huhns für wissenschaftliche Zwecke verwendet, gilt sogar als der erste wissenschaftliche Modellorganismus überhaupt. Im 19. Jahrhundert wurde das Hühnerei zu dem Studienobjekt der Entwicklungsbiologie [10]. Die Nutzung des Hühnereies in der Wissenschaft hat sich im Laufe der Zeit den Forschungsschwerpunkten der Epochen angepasst. Frühe Forschungen beschäftigten sich ausschließlich mit Fragen der embryonalen Entwicklung [49]. Zur Vermehrung von Viren wird das Hühnerei als Wirtsorganismus seit 1936 verwendet [20]. Schon früh wurde die leichte Zugänglichkeit der CAM erkannt und genutzt. Die Kultivierung von Tumoren auf der CAM und die anschließende Verwendung als Testsystem für antitumorale Wirkstoffe ist eine der bekanntesten wissenschaftlichen Anwendungen des Hühnereies [75].

Die starke Vaskularisierung der CAM bildet auch die Grundlage für einen Irritationassay, zur Klassifizierung der Schleimhautreizung von Chemikalien und Kosmetika. Im Draize-Test werden Kaninchenaugen mit zu testenden Substanzen in Kontakt gebracht und die Reaktion ausgewertet [31]. Als Ersatz für den von vielen Personen als unverhältnismäßig brutal eingeschätzten Draize-Test wird schrittweise der 1986 von Lübke veröffentlichte HET-CAM-Test eingeführt [62], der anstelle des Kaninchenauges die CAM als reaktives Gewebe verwendet. Die mögliche Nutzung des Hühnereies in anderen Forschungsbereichen empfiehlt sich vor allem durch die Immuntoleranz des Hühnerembryos [96]. Die CAM findet des Weiteren Anwendung bei der Untersuchung des Prozesses der Vaskularisierung [6]. Die einzige bekannte

Nutzung des Hühnereies, die in die Richtung eines Tissue Engineerings zielt, stammt von Dohle et. al., welche die CAM zur Kultivierung verschiedener Gewebe nutzt [30].

Außerordentlich wichtig für die experimentellen Arbeiten dieser Arbeit ist die Kultivierung von Hühnerembryonen. Die bisher beschriebenen In-vitro-Kulturformen für Vogelembryonen (Abbildung 8) lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Kultivierung der Embryonen in der natürlichen Eierschale (in ovo) und schalenlose Kulturformen (ex ovo). Grundsätzlich gilt hier, dass die Auswahl der Methode maßgeblich von der Dauer und der Art des Experimentes abhängig ist [17]. Bei den meisten Kulturformen wird ein Loch in die Schale des bebrüteten Eies geschnitten, um Zugang zu den embryonalen Geweben zu erhalten. Dies bringt viele Nachteile in der Dokumentation und Manipulation mit sich [86, 54]. Auerbach entwickelte eine Ex-ovo-Technik, bei welcher der Embryo an Tag 3 der Inkubation in eine Petrischale überführt wird, welche in eine weitere Petrischale mit Wasser zu stellen ist. Die maximale Kultivierungsdauer des Embryos mit dieser Methode ist bis Tag 20 beschrieben, ein Schlupf demnach nicht möglich [5].

1988 veröffentlichte Perry ein erstes In-ovo-Kultursystem mit der Möglichkeit der erfolgreichen Kultivierung für die gesamte Entwicklung des Huhnes bis zum erfolgreichen Schlupf. Bis heute ist es das einzige Kultursystem für Hühner, welches die gesamte embryonale Entwicklung abdeckt und nicht die eigene Schale benutzt. Die Kultivierung nach Perry wird in 3 unterschiedlichen Systemen durchgeführt, von denen das letzte den größten Zeitraum der Entwicklung abdeckt (Tag 3-21). Dieses besteht aus einem am stumpfen Ende aufgeschnittenen Halb-Ei, welches mit einem für 72 Stunden inkubierten Embryo gefüllt und durch Frischhaltefolie verschlossen wird. Zwischen dem Embryo und der Abdeckung befindet sich ein Luftraum, welcher die Luftkammer am stumpfen Ende des Eies imitiert. Die Methode zeigt neben der Möglichkeit zum Schlupf den Vorteil einer hohen Überlebensquote [82]. Die In-ovo-Kultur nach Perry erscheint im Blick auf Überlebensrate und Schlupf ein gut geeignetes Kultivierungssystem zu sein und bildet den Ausgangspunkt für diese Arbeit.

Einleitung

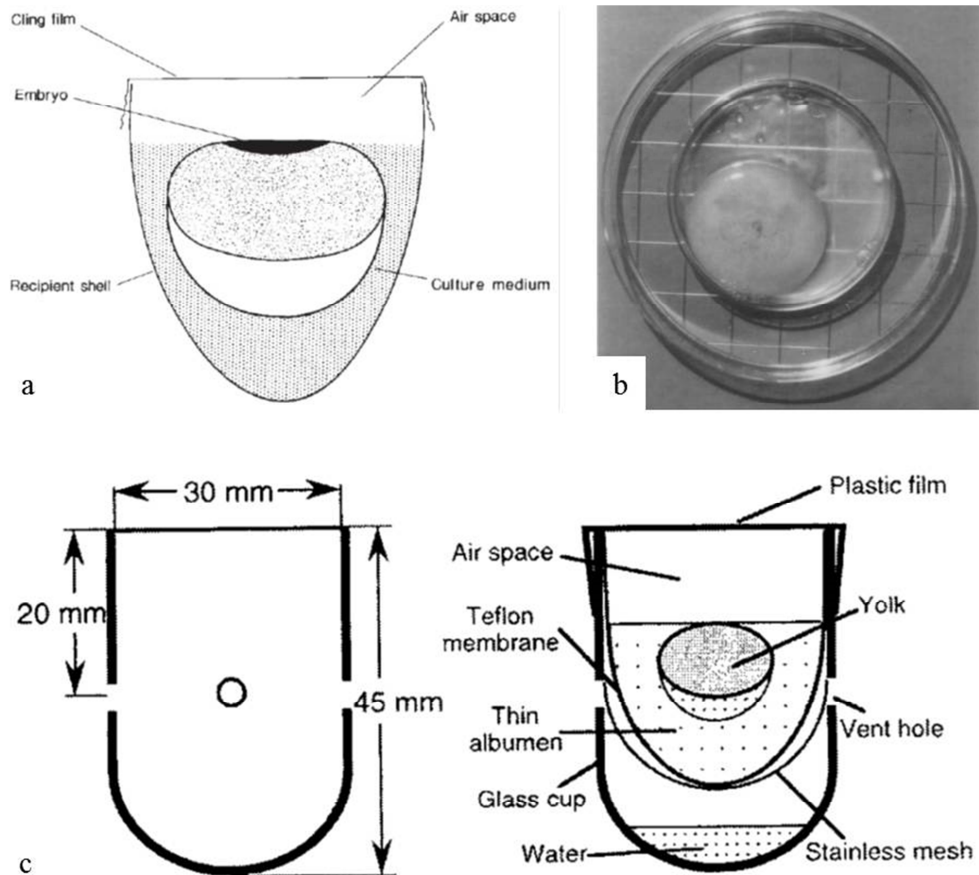


Abbildung 8: Kulturformen für Vogelembryonen. a) In-ovo-Kultivierungssystem nach Perry [82]. b) Ex-ovo-Kultur nach Auerbach [5]. c) Komplett künstliches Kultursystem für die Wachtel (*Coturnix coturnix*) nach Kamihira [51]

Optimal für die Kultivierung von Embryonen zu wissenschaftlichen Zwecken wäre ein vollständig künstliches System mit der Möglichkeit zum Schlupf. Ein künstliches System bietet gegenüber einem natürlichen System den Vorteil in seinen Eigenschaften bekannt und wenig variabel zu sein. Solch ein System ist für das Huhn nicht bekannt. Für die Wachtel wurde allerdings ein vollständig künstliches System zur Kultivierung des Embryos veröffentlicht [51]. Als Kulturbedälter wird hierfür eine Teflonfolie in einem Stahlnetz verwendet, wobei die stark gefaltete Oberfläche dieser Ex-ovo-Kultur auffällt. Die Kontaktfläche des Embryos zum Gefäß ist in der Natur sowie in jeder anderen erfolgreichen Kulturform glatt. Von einer Wiederholung dieser Kultivierungsexperimente ist seit 1998 nichts bekannt geworden.

Für die experimentelle Arbeit und eine Modifizierung des Vogeleies zum Tissue Engineering-System ist es notwendig, experimentelle Manipulationen durchführen zu

können. Nach jeder Veränderung ist ein Test notwendig, der eine Aussage ermöglicht, ob die Veränderung einen Einfluss auf die Funktionalität des Modellorganismus hat. Dieser Test muss zugleich handhabbar, präzise und eindeutig sein. Für das Ei kann aus unserer Sicht nur der Schlupf eines gesunden Kükens, welcher eine vollständige und richtige Embryonalentwicklung voraussetzt, diesen Test darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Reagenzien	Hersteller
Acutase	Life Technologies, Darmstadt
Adipogenes Differenzierungs-Kit	Lonza, Köln
Agar, Pulver	VWR International, Darmstadt
AKD-Leim	Gesim, Großerkmannsdorf
Alpha-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Amphoterin B	Carl Roth, Karlsruhe
Ampizillin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Azeton	VWR International, Darmstadt
Bacillol AF	Varitech, Merchweiler
Bodipy (493/503)	Life Technologies, Darmstadt
Karnaubawachs	Sigma Aldrich, Deisenhofen
CASYton	Innovatis, Reutlingen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase P	Fisher Scientific, Nidderau
DAPI-Reagenz	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dexamethason, wasserlöslich	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Einbettlösung Tissue Tek O.C.T.	VWR International, Darmstadt
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure, konzentriert	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
FKS Gold, fötales Kälberserum	PAA, Marburg

FKS Sigma, fötales Kälberserum	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fluoreszeindiazetat	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen
G418-Bisulfat Salz	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Gelatine	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hämalaunlösung nach Meyer	Carl Roth, Karlsruhe
Hexamethyldisilazan	Sigma Aldrich, Deisenhofen
IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Indomethazin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Insulin, human	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalzium L-Laktat Hydrat $\geq 85\%$	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kalziumchlorid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
M199 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
N2 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumcacodylattrihydrat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriummetasilikat (Wasserglas)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Oil-Red-O Pulver	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Osmiumtetroxid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Parylene [®] C	Paratech Coating, Aliso Viejo, CA, USA
Patentblau V	Sigma Aldrich, Deisenhofen
PBS (phosphate buffered saline), pH 7,2	Invitrogen, Karlsruhe
PDMS (Polydimethylsiloxan) Sylgard [®] 184	Dow Corning, Midland, MI, USA
Penizillin/Streptomycin (10000 U/ml/10000 $\mu\text{g/ml}$)	Fisher Scientific, Nidderau
Phenyl-Methylsilikonöl BOP 200 d=1,07	L. Böwing, Flörsheim am Main
Poly(2-Hydroxyethyl methacrylat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, 1M	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Sigmacote [®]	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Silikon MED10-6640	NuSil, Carpinteria, CA, USA

Material und Methoden

Silikon MED6015	NuSil, Carpinteria, CA, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Wasser, entionisiert	B. Braun, Melsungen

2.1.2 Verbrauchsmaterial und Gebrauchsgegenstände

Material	Hersteller
Autoklavierindikator	VWR International, Darmstadt
Bacillol AF	VWR International, Darmstadt
Bechergläser	Schott, Mainz
Besteckkästen, Edelstahl	VWR International, Darmstadt
Bruteier, Huhn	LSL, Dieburg
Deckgläser	VWR International, Darmstadt
Druckmaterial für 3D Drucker Vero White plus	Stratasys, Eden Prairie, MN, USA
Druckmaterial für 3D-Drucker MED610	Stratasys, Eden Prairie, MN, USA
Eierschalensollbruchstellenverursacher	Oswald Handel, Zapfendorf
Einbettmedium Tissue Tek [®]	VWR International, Darmstadt
Eindeckmedium, Roti Mount aqua	Carl Roth, Karlsruhe
Einfriergefäße, Kunststoff	VWR International, Darmstadt
Einmalhandschuhe, Latex	VWR International, Darmstadt
Einmalhandschuhe, Nitril	VWR International, Darmstadt
Einmalpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalspritzen, verschiedene	B. Braun, Melsungen
Einwegskalpelle, steril	B. Braun, Melsungen
Filterhülsen, Fiberglas	Sartorius, Göttingen
Filterhülsen, Quarz	Sartorius, Göttingen
Filterhülsen, Zellulose	Sartorius, Göttingen
Frischhaltefolie	Lakeland, Windemere, UK
Gelatineschwämme Gelastyp [®]	Sanofi Aventis, Berlin
Gewebeklebstoff Histoacryl [®]	B. Braun, Melsungen

Hühnereier XXL, unbefruchtet	Vogelgesang, Ommersheim
Hühnereier, unbefruchtet	Vogelgesang, Ommersheim
Hühnerfutter	Raiffeisen Handel, Ormesheim
Kanülen, steril, verschiedene Größen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kükenfutter	Raiffeisen Handel, Ormesheim
Kunststoffröhrchen 15 ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kunststoffröhrchen 50 ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nummerierungsringe für Hühner	Siepmann, Herdecke
Objektträger, Glas	VWR International, Darmstadt
Parafilm®	VWR International, Darmstadt
Petrischalen aus Kunststoff, verschiedene Größen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH- Papierindikator	VWR International, Darmstadt
Pinzetten, verschiedene	VWR International, Darmstadt
Pipettierhilfe, Pipetboy acu	VWR International, Darmstadt
Pipettierhilfen 10-1000 µl Eppendorf	VWR International, Darmstadt
PTFE-Membran, 450 nm Poren	Sartorius, Göttingen
PTFE-Membran, 500 nm Poren	Sartorius, Göttingen
Reagenzienflaschen, verschiedene Größen	Schott, Mainz
Rührfische, verschiedene	VWR International, Darmstadt
Säulenmaterial FicollPaque Plus	Amersham Biotech, Freiburg
Scheren, verschiedene	VWR International, Darmstadt
Spatel, verschiedene	VWR International, Darmstadt
Wattestäbchen, steril	VWR International, Darmstadt
Zellkulturflaschen, verschiedene	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellnetze 70 µm Maschengröße	BD Bioscience, Heidelberg

2.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
3D-Drucker Connex 500	Stratasys, Eden Prairie, MN, USA
Analysewaage Sartorius CP64	Sartorius, Göttingen

Material und Methoden

Autoklav Tuttbauer 3850 EL	Biomedis Laborservice, Gießen
Begasungsbrutschrank Typ BBD6220	Thermo Scientific, Langenselbold
Binokular Olympus SZX 9	Olympus, Hamburg
Biologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Datenlogger MSR	MSR Electronics, Seuzach, Schweiz
Einfrierhilfe, Mr. Frosty	Thermo Scientific, Langenselbold
Fluoreszenzbinokular Olympus SZX16	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX71	Olympus, Hamburg
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Heizrührplatte Heidolph Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
Kaltlichtquelle KL1500 LCD	Opto Sonderbedarf, Gräfelfingen
Kamera µEye XS	IDS, Obersulm
Kamera Canon Ixus 240 HS	Conrad Electronic, Hirschau
Kamera Sony XCG 5005	Conrad Electronic, Hirschau
Kamera Sony α580	Conrad Electronic, Hirschau
Kontaktwinkelmessgerät, OCA 20	Dataphysics, Filderstadt
Kryotom Leica CM3050	Leica, Solms
Kühlschrank Lovibond, 16 °C	Tintometer, Dortmund
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Kükenheim mit Wärmequelle	Siepmann, Herdecke
Luxmeter Voltcraft LX-1108	Conrad Electronic, Hirschau
Magnetrührer Variomag Biosystem	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Messschieber	Burg-Wächter, Wetter
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Hera safe HS18	Biomedis Laborservice, Gießen
Motorschrankbrüter Bruja 168/EM	Brutmaschinen Janeschitz, Hammelburg
Motorschrankbrüter Hemel Top Profi 300	Hemel Brutgeräte, Kaunitz
Multifunktionswerkzeug Dremel 400	GW-Werkzeuge, Nürnberg
Orbitalschüttler PSU-10i	AutoQ Biosciences, Solingen
Sauerstoffkonzentrator, Everflow OPI	Philips Respironics, Amsterdam, NL
Sauerstoffmessgerät, Greisinger GOX 1000 O ₂	Conrad Electronic, Hirschau
Schlauchpumpe, IPC-N	IDEX Heath&Science GmbH, Wertheim
Tiefkühlschrank Heraeus HFU486, -80 °C	Thermo Scientific, Langenselbold
Trockenschrank Binder ED 115	Binder GmbH, Tuttlingen

Vakuumofen, Vacutherm 25L	Thermo Scientific, Langenselbold
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zellzählgerät Innovatis CASY TT	Innovatis, Reutlingen
Zentrifuge, Biofuge Primo R	Innovatis, Reutlingen

2.1.4 Zellkulturmedien und Arbeitslösungen

Kulturmedium für hMSC

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS Sigma	15 % (v/v)
in Alpha-MEM	

Kulturmedium für L929

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS Gold	10 % (v/v)
in RPMI 1640 (+L-Glutamin)	

Kulturmedium für CHO-GFP

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS Gold	10 % (v/v)
G418 in H ₂ O (0,1g/ml)	1 %
in Alpha-MEM	

Kulturmedium für Herzmuskelsphäroide

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
N2-Supplement	1 % (v/v)
in DMEM (high glucose, +L-Glutamin)	

Präparationsmedium für Herzmuskelsphäroide

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS Sigma	10 % (v/v)
in M199 (+L-Glutamin)	

Einfriermedium

FKS	90 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Material und Methoden

Adipogenes Differenzierungsmedium

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Dexamethason	100 nM
IBMX	500 µM
Indomethazin	200 µM
Insulin	0,1 µg/ml
FKS Sigma, hitzeinaktiviert in Alpha-MEM	10 % (v/v)

Oil-Red-O-Färbelösung

Oil-Red-O-Pulver in Isopropanol	0,3 % (w/v)
------------------------------------	-------------

DAPI-Färbelösung

DAPI in PBS	0,05 µg/ml
----------------	------------

Bodipy[®]-Färbelösung

Bodipy [®] (493/503) in PBS	30 µg/ml
---	----------

Bodipy[®]-Permeabilisierungslösung

Triton X 100	0,2 % (w/v)
FKS Gold in PBS	5 %

Lebend/Tot-Färbelösung

Propidiumiodid	40 µg/ml
Fluoreszeindiazetat in PBS	30 µg/ml

Cacodylatpuffer

Natriumcacodylattrihydrat	0,3 M
Salzsäure 1M in Wasser	bis pH 7,3

EM-Fixatorlösung

Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer	25 % (v/v)
-------------------------------------	------------

Nachfixierlösung für EM

Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer	1 % (w/v)
--------------------------------------	-----------

Eosin-Lösung

Eosin G in Wasser, gefiltert	0,5 % (w/v)
---------------------------------	-------------

2.1.5 Zelllinien und Primärzellen

Zellen	Bezugsquelle
CHO-GFP (Ovariumszellen des chinesischen Hamsters)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
Herzmuskelzellen (Huhn)	Präparation am IBMT, Hühnerembryonen 6,5 Tage bebrütet
hMSC (humane mesenchymale Stammzellen)	Präparation am IBMT, Oberschenkelhüftkopf
L929 (murine Fibroblasten)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für das Tissue Engineering ist die Kultivierung von Zellen ein essentieller Bestandteil. Zur Untersuchung des Ansatzes dieser Arbeit ist es daher zwingend notwendig, die Kultivierbarkeit von Fremdzellen im Ei zu prüfen. Hierzu wurden folgende In-vitro-Zellkulturtechniken verwendet.

Adhärenz Zellkultur

Die adhärenz Zellkultur dient der Vermehrung von Zellen zur Verwendung im Experiment oder zur Kryokonservierung.

Zur Kultivierung von adhärenz wachsenden Zellen wurden Kulturgefäße aus Polystyrol verwendet. Die Inkubation erfolgte in einem klimatisierten Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit (RH). Vor Erreichen der Konfluenz (je nach Zelltyp 70-90 % der Oberfläche bedeckt) wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und

die Kultur mit PBS gespült. Die Zellen wurden bei 37 °C für fünf Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und so von der Oberfläche abgelöst. Durch die Zugabe von serumhaltigem Medium wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert. Die durch Klopfen gelösten Zellen wurden für fünf Minuten bei 1000 UpM und Raumtemperatur durch Zentrifugieren sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment in frischem Medium gelöst und mittels Zellzahlmessgerät die Anzahl und Größe der Zellen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen entweder weiterkultiviert, im Experiment verwendet oder zur Kryokonservierung vorbereitet.

Suspensionskultur in der Spinnerflasche

Die Suspensionskultur wurde zur Generierung von CHO-K1-GFP-Sphäroiden (CHS), kleinen wenige bis mehreren hundert µm durchmessende kugelförmige Zellansammlungen, genutzt.

Hierzu wurden die Zellen aus der adhärenen Zellkultur wie beschrieben entnommen. In der mit Sigmacote[®] beschichteten Spinnerflasche (Innenflächen benetzen, für 15 Minuten bei 70 °C verdampfen, dreimal mit destilliertem Wasser spülen und autoklavieren) wurde auf 37 °C gewärmtes Medium vorgelegt und mit den Zellen (100000 Zellen/ml) versetzt. Bei einer Kultivierung im Brutschrank bei 37,0 °C, 90 % RH und Rühren mit 80 UpM entstanden nach 6 Tagen Sphäroide mit einem mittleren Durchmesser von 120 µm.

Bestimmung der Zellzahl mittels CASY[®]

Die Bestimmung der Zellzahl erlaubt eine Beurteilung des Proliferationsverhaltens kultivierter Zellen sowie eine genaue Aliquotierung.

Die Zellzahl sowie die Größe der Zellen wurden mit einem Zellzahlmessgerät CASY[®] bestimmt. Das CASY[®] funktioniert nach dem Prinzip der zeitaufgelösten Widerstandsmessung in einer Kapillare. Die Zellen werden in einer Salzlösung suspendiert und durch eine Kapillare mit definierter Geometrie gesogen. In der Kapillare passieren die Zellen eine Pore an die eine Spannung angelegt ist. Zu dem Zeitpunkt, an dem eine Zelle die Pore passiert, erhöht sich der Widerstand kurzzeitig. Das Ausmaß der Widerstandsänderung ist von Größe und Vitalität der Zelle abhängig. Tote Zellen mit geschädigter Membran bieten dem elektrischen Strom weniger

Widerstand als Zellen mit intakter Membran. Eine integrierte Analyseeinheit errechnet aus den Messwerten die Zellgröße und die Zellzahl.

Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen erlaubt die Lagerung von Zellen über längere Zeitspannen zur späteren Verwendung. Auch das ist ein für das Tissue Engineering unverzichtbarer Prozess.

Die Füllung der Einfrierhilfe mit Isopropanol erfolgte bei Raumtemperatur. Entsprechend der Anzahl der Proben wurden Einfriergefäße beschriftet und bereitgestellt, das Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) auf 4 °C gekühlt. Nach dem Zentrifugieren wurde die gewünschte Zellzahl mit dem Volumen des Einfriermediums so eingestellt, dass pro Einfriergefäß 1 ml Zellsuspension der gewünschten Konzentration eingebracht werden konnte. Die gefüllten Einfriergefäße wurden in die Einfrierhilfe gesetzt und über 24 Stunden auf -80 °C gekühlt. Nach 24 Stunden erfolgte die Umlagerung der Proben in einen Kryotank, wo sie in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs bis zur weiteren Verwendung lagerte.

Auftauen von Zellen

Der Prozess des Auftauens soll Zellen möglichst schonend aus dem gefrorenen Lagerzustand zurück in ihre kultivierbare und proliferative Form bringen.

Die eingelagerten Einfriergefäße wurden dem Kryotank entnommen und in Trockeneis zum Labor transportiert. Im 37 °C warmen Wasserbad erfolgte der Auftauprozess. Warmes Kulturmedium wurde der aufgetauten Probe zugegeben und 1 Minute bei 1000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in frischem, warmem Medium gelöst. Die Suspension wurde nun in einer Zellkulturflasche kultiviert, wobei die Konzentration der Zellsorte entsprechend gewählt wurde.

Zellkultur auf der Vitellinmembran

Im Rahmen der Untersuchung zur Eignung der verschiedenen Komponenten des Eies wurde die Kultivierung von Zellen auf der VM durchgeführt. Hierzu musste wegen der mechanischen Eigenschaften der VM vom Kultivierungsprotokoll für adhärent wachsende Zellen abgewichen werden.

Material und Methoden

Um eine Kultivierung von Zellen auf der sphärischen VM mit annehmbarer Dokumentationsqualität durchführen zu können, muss die VM in eine planare Form gebracht werden. Eine besondere Schwierigkeit bei der Handhabung der VM bestand darin, dass sie sich an der Luft zu einem Filament aufrollt und nur unter Flüssigkeit entfaltet vorlag. Da für diese Anwendung kein System vorhanden war, wurde ein System entwickelt, welches diesen Randbedingungen Rechnung trägt (Abbildung 9). Zunächst wurde die VM so aufgeschnitten, dass etwa eine 2 cm durchmessende unbeschädigte Fläche der VM frei lag. Diese wurde dann unter PBS auf dem unteren Ring positioniert und mit dem oberen Ring festgeklemmt. Beide Ringe werden mit zwei Schrauben zusammengehalten. Die Vorrichtung wurde so konstruiert, dass sie in standardisierte 6-Loch-Platten eingesetzt werden kann. Die dabei nutzbare Kulturfläche auf der VM ist beinahe eben und beträgt $1,13 \text{ cm}^2$. Die Inkubation erfolgte in einem klimatisierten Inkubator bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ } \%$ CO_2 und $90 \text{ } \%$ RH.



Abbildung 9: VM Kultivierungssystem. Links: VM in aufgerolltem Zustand an der Luft. Mitte: Aufspannvorrichtung aus oberem und unterem Ring. Rechts: Aufspannvorrichtungen in 6-Loch-Platte

Dotterkultur von Zellen

Im Rahmen der Untersuchung der verschiedenen Komponenten des Eies auf ihre Eignung zur Kultivierung von Fremdzellen wurde auch die Kultivierung von Zellen auf dem Dotter durchgeführt. Hierzu musste wegen der geometrischen Eigenschaften des Dotters vom Kultivierungsprotokoll für adhärent wachsende Zellen abgewichen werden.

Um die Kultivierung von Zellen auf dem Dotter durchführen zu können, musste ein neues Kultivierungssystem entwickelt werden (Abbildung 10). Das Kultursystem besteht aus einem Kunststoffgefäß, in das ein Dotter eingesetzt wurde. In ersten

Vorexperimenten mit L929, die auf den Dotter aufgebracht wurden, zeigte sich, dass sich die Zellen noch vor dem Anwachsen am Rand sammelten und zwischen dem Dotter und der Gefäßwand sedimentierten. Die Abdichtung der Kulturfläche an der Seite und die Schaffung einer Kavität erschienen daher zwingend erforderlich. Der Abschluss der Kulturfläche gelang durch das Einsetzen von Gelformen. Als geeignetes Material zeigte sich Agar (2 % in PBS). Das Gel wurde in eine zylindrische Form gegossen und nach dem Aushärten bündig auf den Dotter gesetzt. Der über das Gefäß überstehende Rand wurde mit einem Skalpell abgetrennt, um den Abschluss mit einem Deckel zu ermöglichen. Durch das Gel konnte die Wölbung des Dotters in der Kultivierungsfläche minimiert werden. Um das Reißen der VM beim Mediumswechsel zu vermeiden, wurde ein Fluidikeinsatz entwickelt, der in das Gel eingegossen wurde. Über die beiden Anschlüsse wurde kontinuierlich mit einer Schlauchpumpe (IPC-N) frisches Medium der Kultur zugeführt und verbrauchtes Medium abtransportiert. Über den Zeitraum von zehn Tagen konnte der Füllstand des Mediums in der Kultur bei einer Flussrate von 1 ml/Tag konstant gehalten werden. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % RH.

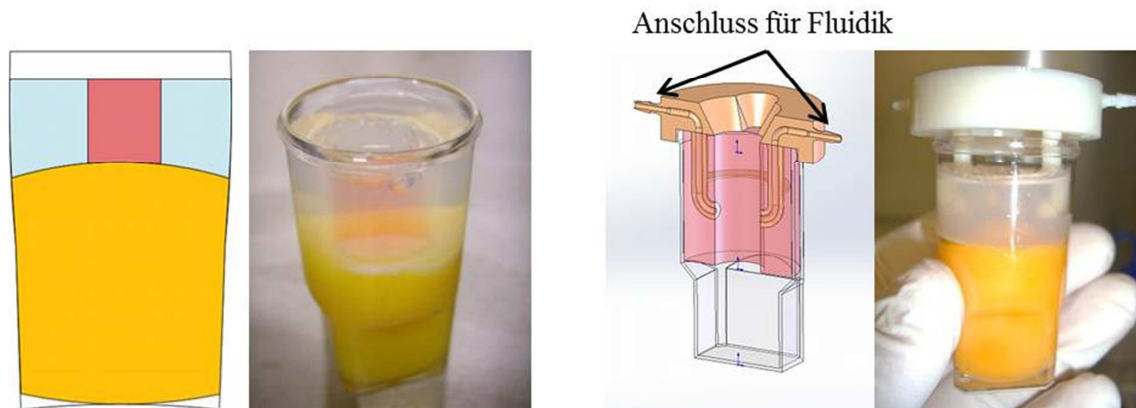


Abbildung 10: Dotterkulturen zur Untersuchung der Kultivierungseigenschaften von Zellen auf dem Dotter. Links: Dotterkultur in Kulturgefäß mit Agargel und Kulturfläche. Rechts: Dotterkultur mit Fluidikeinsatz für automatisierten Mediumswechsel

2.2.2 Färbungen

Die Färbung von Zellen und Geweben erlaubt je nach Fragestellung des Experimentes den Nachweis bestimmter Strukturen oder Eigenschaften der gefärbten Proben. Färbungen wurden als Nachweismethode bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten benötigt.

Oil-Red-O-Färbung

Oil-Red-O ist ein lipophiler Farbstoff, der sich in unpolaren Zellkompartimenten, besonders gut in Lipidvesikeln, anreichert. Die Oil-Red-O-Färbung wurde als Nachweis der erfolgreichen adipogenen Differenzierung von hMSC verwendet.

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen für 30 Minuten in 10 %iger Formalin-Lösung. Danach wurde das Formalin abgenommen und die Kultur wiederholt mit destilliertem Wasser gespült. Hierauf folgte eine Überschichtung der Zellen mit 60 % Isopropanol, was eine Permeabilisierung der Zellmembran bewirkte. Nach drei Minuten wurde dieser Prozess durch das Entnehmen der Lösung gestoppt. Die Färbung erfolgte mit einer 0,3 % Lösung (w/v) von Oil-Red-O-Pulver in Isopropanol. Eine vollständige Färbung war nach fünf Minuten erreicht. Mit PBS gewaschen und überschichtet wurden die Zellen bis zur Dokumentation bei 4 °C dunkel gelagert.

Bodipy[®] (493/503)-Färbung

Ähnlich der Oil-Red-O-Färbung wurde die Färbung mit Bodipy[®] (493/503) zum qualitativen Nachweis für Lipide eingesetzt. Bodipy[®] akkumuliert wie Oil-Red-O in unpolaren Kompartimenten und fluoresziert nach Anregung grün (488 nm).

Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 3,7 % Formaldehyd für 15 Minuten. Nach Entfernen der Fixierungslösung und dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit der Permeabilisierungslösung (Triton X 0,2 %, FKS Gold 5 % in PBS) bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit der Bodipy[®]-Färbelösung überschichtet. Dies erfolgte über 60 Minuten bei 37 °C im

Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 Minuten mit DAPI-Färbelösung gegengefärbt. Nach abschließendem mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen bis zur Dokumentation dunkel, bei 4 °C, gelagert.

Lebend/Tot-Färbung (L/T)

Mit dieser Färbung können tote und lebende Zellen unterschiedlich angefärbt und eine Einschätzung über die Vitalität einer Zellpopulation abgegeben werden. Der grün fluoreszierende Farbstoff Fluorescein wird nur in lebenden Zellen durch enzymatische Abspaltung von Azetatresten aus Fluoresceindiazetat (FDA) gebildet. Daher zeigen nur lebende Zellen eine grüne Fluoreszenz. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert in die DNA des Zellkerns und kann nur in diesem Zustand angeregt werden. Nur wenn die Zellmembran beschädigt ist, kann PI zum Zellkern gelangen. Daher zeigen nur tote oder beschädigte Zellen ein rotes Fluoreszenz-Signal.

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach einer kurzen Inkubation mit der L/T-Färbelösung für 15 Sekunden wurde mit PBS gespült und mit frischem PBS überschichtet. Bis zur Dokumentation wurden die Proben im Kühlschrank dunkel gelagert. Die Dokumentation erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Anregung_{FDA} 470 nm, Emission_{FDA} 525 nm; Anregung_{PI} 555 nm, Emission_{PI} 602 nm).

DAPI-Färbung

DAPI färbt die Kerne von Zellen und erlaubt so die Abgrenzung zu anderen Strukturen oder bei mononukleären Zellen die Bestimmung der Zellzahl.

Das Kulturmedium wurde von den zu testenden Zellen abgesaugt und zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten in 10 % Formalin-Lösung fixiert. Nach 30 Minuten wurde das Formalin abgenommen und die Kultur zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch die Überschichtung mit 60 % Isopropanol, dem das DAPI-Reagenz in einer Konzentration von 1 µg/ml für drei Minuten zugesetzt wurde. Die Permeabilisierung der Zellen wurde durch das Entnehmen der Lösung gestoppt. Mit PBS gewaschen und überschichtet wurden die Zellen bis zur Dokumentation bei 4 °C dunkel gelagert.

Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E)

Die H/E-Färbung ist eine Übersichtsfärbung die Kontraste in Gewebestrukturen hervorhebt. In dieser Arbeit wurde sie zur besseren Detektion von Strukturen in Gewebeschnitten durchgeführt.

Kryoschnitte auf Objektträgern wurden aus der Kühlung genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Nachdem die Feuchtigkeit komplett verdunstet war, wurden die Objektträger in Färbegläser gestellt und für zwei Minuten in Hämalaunlösung belassen. Nach dieser Zeit wurden sie mit Leitungswasser zwei Minuten überspült. In ein weiteres Färbeglas wurde destilliertes Wasser sowie ein Tropfen Eisessig gefüllt. Hierin wurden die Objektträger für drei Sekunden eingetaucht, bevor sie für 5-10 Sekunden in die Eosin-Lösung gegeben wurden. Nach Abspülen der überschüssigen Eosin-Lösung mit destilliertem Wasser wurden die Proben mit Eindeckmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.3 Zytotoxizitätstests

Die Untersuchungen zur Eignung des Eies zur Kultivierung der Zellen erforderte weitere Tests als die qualitativen Färbungen. Zytotoxizitätstests erlauben eine quantitative Aussage über den Vitalitätszustand von Zellen.

WST-1-Assay

Der WST-1-Assay erlaubt eine Aussage über den Zustand der Stoffwechselaktivität von Zellen. Die enzymatische Aktivität der Succinat-Tetrazolium-Reduktase, welche Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette ist, wird im WST-1-Assay quantifiziert. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 4-[3-(4-Iodophenyl)2-(4-nitrophenyl)2H-5tetrazolio]-1,3-benzendi-sulfonat wird in der Nachweisreaktion von der Succinat-Tetrazolium-Reduktase zu dem entsprechenden roten Formazan-Farbstoff reduziert (Abbildung 11). Die Aktivität des Enzyms und damit die Menge des dunkelroten Formazans korreliert direkt mit dem Stoffwechsel der Zellen [73].

Für den WST-1-Test wurde das WST-1 Kit von Roche verwendet. Die Zelllinie L929 wurde in einer Konzentration von 10^4 Zellen/96er Loch ausgesät und für 24 Stunden inkubiert (37,0 °C, 90 % RH, 5 % CO₂). Nach Ablauf dieser Zeit wurde die zu testende

Substanz auf die Zellen gegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das WST-Reagenz wurde dem Kulturmedium direkt zugegeben und mit einem Rotationschüttler kurz vermischt. Danach wurde im ELISA-Reader alle 30 Minuten die optische Dichte der Lösungen bestimmt. Zwischen den Messungen wurden die Kulturen im Brutschrank aufbewahrt. Die Messungen wurden abgebrochen, sobald ein Messwert die optische Dichte von 2 erreicht hatte. Die letzte Messreihe vor Erreichen der optischen Dichte von 2 wurde zur Auswertung genutzt. Jede getestete Probe wurde in einer Achtzehnfachbestimmung untersucht und mit einer positiv- (Kulturmedium, Normierung auf 100 %) und einer negativ Kontrolle (Triton X 100) vermessen. Die Durchführung des Tests entsprach der ISO-Norm 10993.

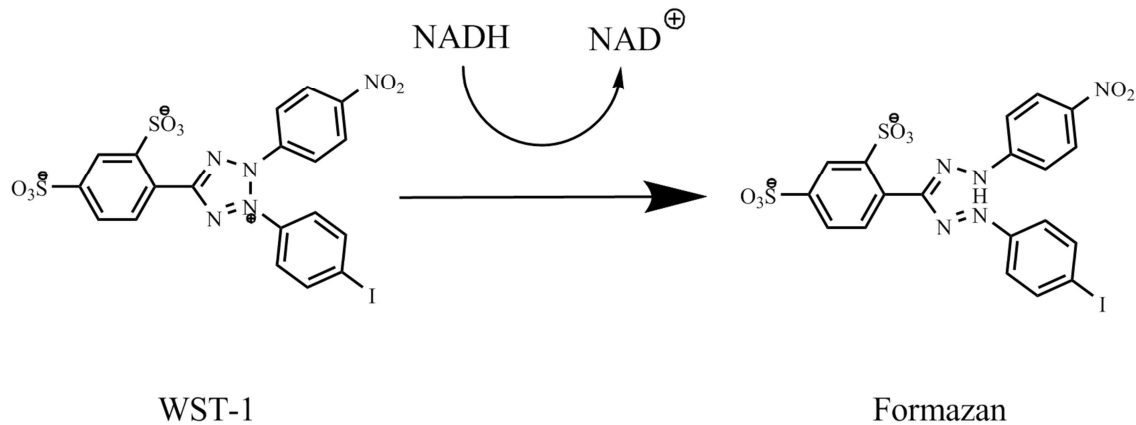


Abbildung 11: Schlüsselreaktion des WST-Assay ist die Bildung des roten Formazan-Farbstoffs. Links: hellrotes WST-1 Salz. Rechts: dunkelrotes Formazan

Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Assay

Der BrdU-Test ermöglicht die Quantifizierung der zellulären Proliferationsrate. Dabei wird der Einbau des Thymidin-Analogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in die DNA der proliferierenden Zellen detektiert. Diese Detektion erfolgt über eine antikörpergebundene enzymatische Reaktion, bei der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in ein blaues Produkt überführt wird. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt und im ELISA-Reader ausgewertet.

Für den BrdU-Test wurde das Cell Proliferation ELISA BrdU-Kit von Roche verwendet. Die Zelllinie L929 wurde in einer Konzentration von 10^4 Zellen/96er Loch ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und durch die zu testende Substanz ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen für zwei Stunden mit einer $10\ \mu\text{M}$ BrdU-Lösung überschichtet. Nach dem Einbau des BrdU in die DNA wurden die Proben mit der Fixierungs- und Denaturierungslösung bei RT für 30 Minuten behandelt. Nach dem Waschen mit Waschpuffer wurde die Antikörperlösung zugesetzt. Durch dreimaliges Spülen wurde ungebundener Antikörper mit dem Waschpuffer entfernt. Nach Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ Substratlösung wurde für fünf Minuten auf einem Rotationsschüttler gemischt und die Reaktion mit $250\ \mu\text{l}$ 1M Schwefelsäure gestoppt. Gemessen wurde die optische Dichte im ELISA-Reader. Jede getestete Substanz wurde in einer Achtfachbestimmung untersucht und mit einer positiv- (Kulturmedium, Normierung auf 100 %) und einer negativ Kontrolle (TritonX 100) vermessen[63]. Der Test wurde nach ISO-Norm 10993 durchgeführt.

2.2.4 Isolierungen und Präparationen

Für die Untersuchungen erschien es zielführend, sowohl Zelllinien als auch Stammzellen zu nutzen. Beide unterscheiden sich nicht nur in ihren Funktionen teils stark voneinander, sondern auch in ihren Eigenschaften. Die Fähigkeit der Stammzellen zur Differenzierung ist ein Aspekt der Zellkultur, der in den Untersuchungen berücksichtigt werden sollte. Stammzellen neigen nach einiger Zeit in Kultur dazu, ihre Fähigkeit zur Differenzierung zu verlieren. Daher wurden die verwendeten Stammzellen frisch präpariert. Bei der VM und den Herzmuskelsphäroiden wurden ebenfalls frische Präparate für den experimentellen Einsatz generiert.

Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC)

Die Isolierung der hMSC erfolgte aus Oberschenkelköpfen, die vom evangelischen Krankenhaus Zweibrücken bezogen wurden. Das Material wurde während des Transports in α -MEM mit 1 % P/S gekühlt gelagert. Mit einem Schaber wurde das trabekuläre Knochengewebe der Innenseite entfernt und in einem 50 ml-Röhrchen mit 10 ml hMSC Medium gesammelt (Abbildung 12). Nach dem Zerkleinern der

Knochenstücke mit einer Schere wurde das Medium in ein frisches Röhrchen überführt und die Knochenfragmente zweimal mit Medium gespült. Anschließend folgte eine zehn minütige Zentrifugierung bei 1500 UpM. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 16 ml Medium gelöst. Um die restlichen Knochenfragmente zu entfernen, wurde die Suspension über einem 70 µm Zellsieb filtriert. Die Auftrennung der Zellfraktionen erfolgte mittels Zentrifugierung über 30 Minuten bei 1000 UpM in einer Säule (12 ml FicollPaque Plus in 50 ml Röhrchen). Von den aufgetrennten Phasen wurde die Oberste verworfen und die helle darauffolgende Phase (mononukleäre Zellen) verwendet. Diese wurde in ein 50ml-Röhrchen überführt, mit zehn ml PBS gewaschen und für fünf Minuten bei 1500 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in 13 ml Kulturmedium aufgenommen, gelöst und in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Nach 3-4 Tagen Kultivierung wurde das Medium erneuert und nach 10 Tagen eine Passage durchgeführt. Die Selektion der hMSC erfolgte über 2-3 Passagen mittels Plastikadhärenz. Erst nach einer weiterführenden Charakterisierung gemäß der Richtlinie des Stammzellkomitees der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie von 2006 wurden die Zellen verwendet.

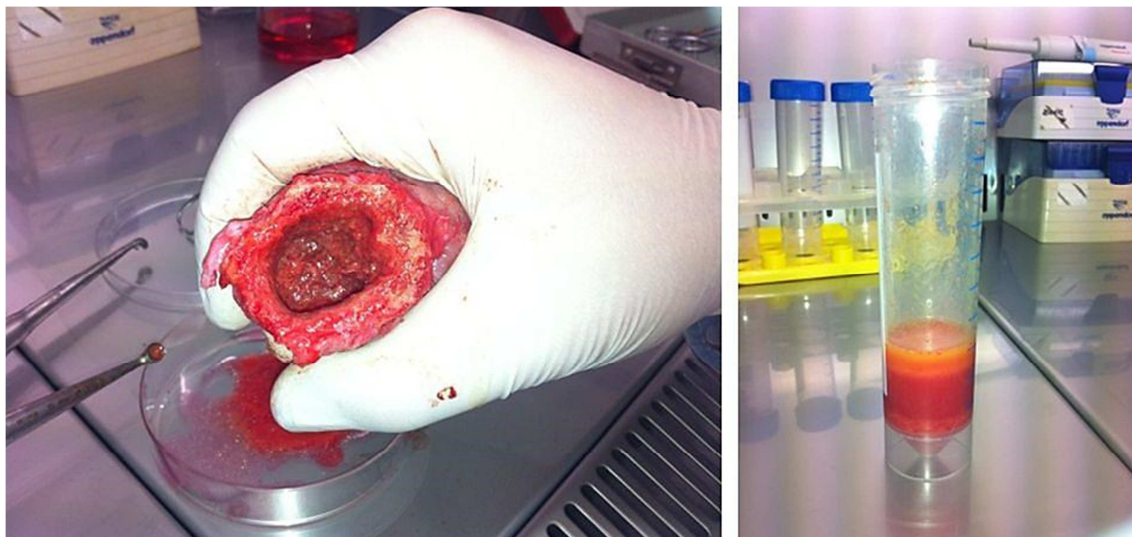


Abbildung 12: Präparation von hMSC aus dem Oberschenkelhalskopf. Links: Ausschaben des Knochenmarks mit einem scharfen Löffel. Rechts: Fraktionen des ausgeschabten Knochens vor der Zentrifugierung (Unten: Knochensplitter, Mitte: Zellsuspension, Oben: Fett und Plasma)

Isolierung der Vitellinmembran (VM)

Für die Isolierung der VM (Abbildung 13) wurden unbefruchtete Hühnereier mit Bacillol gereinigt und mit Hilfe eines Eierschalensollbruchstellenverursachers geöffnet. Durch Dekantieren wurde der Dotter von dem Eiklar getrennt. Noch vorhandene Hagelschnüre wurden mit einer Schere abgeschnitten. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurde der Dotter mit einer Schere geöffnet. Mit zugewaschtem PBS wurde der Dotter ausgewaschen und trübes PBS wurde dekantiert. Dieses Vorgehen wurde wiederholt, bis der Dotter vollständig entfernt war und das PBS klar blieb. Die VM wurde in Schnappdeckelgläsern bei 4 °C bis zur Verwendung, jedoch maximal 14 Tage, gelagert.

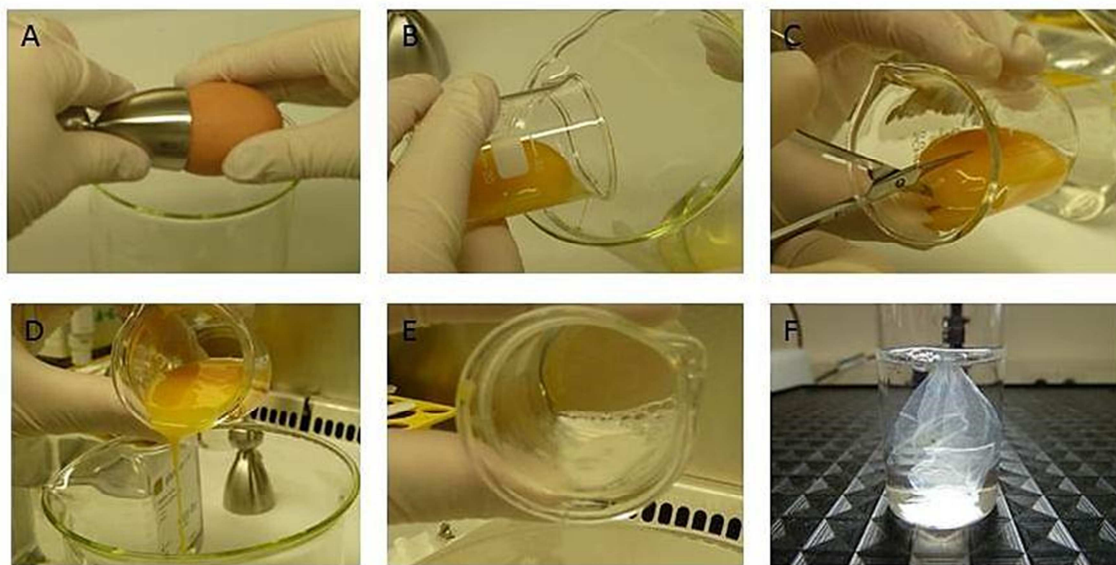


Abbildung 13: Präparation der Vitellinmembran (VM) A) Öffnen des Eies B) Entfernen des Eiklars durch Dekantieren C) Öffnen der VM mit einer Schere D) Auswaschen des Dotters E) Saubere VM im Becherglas F) Lagerung der VM in PBS

Präparation von Herzmuskelsphäroiden (HMS) und Herzmuskelmischsphäroiden (CMS)

Sphäroide sind kleine kugelförmige Zellansammlungen von einigen bis mehrere Hundert μm Durchmesser. Sie bilden den Übergang von Einzelzellen zum Gewebe. Diese Eigenschaft macht sie für Kultivierungsversuche höchst interessant. Für

verschiedene Experimente wurden mehrere verschiedene Sphäroide mit unterschiedlichen Eigenschaften generiert.

Bruteier wurden für 6,5 Tagen bei 37,5 °C, 65 % RH bebrütet. Die Wendung um 30° fand alle zwei Stunden statt. Die Eierschale wurde mit Bacillol gereinigt und anschließend auf einer Seite mit der Pinzette vorsichtig aufgebrochen. Durch eine 3x4 cm große Öffnung wurde der Embryo entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in eiskaltes Präparationsmedium gelegt (Abbildung 14). Um das Herz freizulegen, wurde der Embryo mit einer Schere enthauptet und der Brustkorb mit einer spitzen Pinzette geöffnet.



Abbildung 14: Präparation von Herzen des Hühnerembryos zur Generierung von Herzmuskelzellsphäroiden: A) Öffnen des Eies B) Entnahme des Embryos C) Präparation des embryonalen Herzens

Mit einer Pinzette wurden die Herzen der Embryonen entnommen und bei RT in Präparationsmedium gesammelt. Der mechanischen Zerkleinerung mit einem Skalpell folgte ein Verdau für zehn Minuten bei 37 °C mit 0,05 %/0,02 % Trypsin/EDTA. Die enzymatische Zerkleinerung wurde durch die Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt. Nach Zentrifugierung bei 250 UpM für fünf Minuten und Resuspension in Präparationsmedium (1 ml/ 5 Herzen) wurden die Zellen in 35 mm durchmessenden Zellkulturschalen so ausplattiert, dass jede Schale etwa acht Herzen enthielt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 95 % RH und 5 % CO₂ auf einem Rotationsschüttler mit 80 UpM. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Präparationsmedium gegen das Kultivierungsmedium ausgetauscht. Ein Wechsel des Mediums erfolgte jeden Tag, um die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzellen zu erhalten. Zur Erzeugung der Mischsphäroide wurden den resuspendierten

Herzmuskelzellen CHO-GFP im Verhältnis 1:1 zugegeben. Die Generierung der Misch-Mischsphäroide (CMS) erfolgte analog den HMS.

Anfertigung von Kryoschnitten

Um Gewebe auf seine innere Struktur hin untersuchen zu können, war die Anfertigung von Schnitten notwendig. Diese wurden als Kryoschnitte durchgeführt und erlaubten in Kombination mit einer H/E-Färbung eine Aussage über die Strukturierung der Probe.

Die Proben wurden mit Skalpell und Schere vom restlichen Gewebe getrennt. Mit PBS wurde mehrmals gespült, um Verunreinigungen abzuwaschen. In einer Kunststoffschale wurde bis etwa 1/3 der Füllhöhe Tissue Tek[®] Einbettmedium vorgelegt und bei -20 °C angefroren. Die Probe wurde auf das gefrorene Einbettmedium gelegt und mit einer Pinzette glatt gezogen. Mit weiterem Einbettmedium wurde das Gefäß komplett aufgefüllt. Die Proben wurden bis zum Schneiden am Kryotom bei -80 °C gelagert. Zum Schneiden wurden die Proben auf dem Träger aufgefroren und in 10 µm Schritten abgeschnitten. Die Schnitte wurden mit einem Schnittstrecker geglättet und auf die Objektträger aufgenommen. Nach 24 Stunden Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

Präparation für Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Feinstruktur der Probe im µm Maßstab und können so Hinweise auf deren Funktion liefern.

Die Proben wurden präpariert und zweimal mit Cacodylatpuffer gespült. Die gereinigte Probe wurde in Fixatorlösung bis zur weiteren Vorbereitung bei 8 °C gelagert. Vor der weiteren Fixierung wurde erneut mit frischem Cacodylatpuffer gespült und zur weiteren Fixierung für 60 Minuten mit der Nachfixierlösung überschichtet. Die Wirkung des Osmiums wurde mit einer Methanol/Ascorbinsäure-Lösung neutralisiert. Anschließend wurden die Proben für jeweils 3 Minuten in einer Ethanolreihe von 30, 50, 70, 80, 90 bis 96 % entwässert. Daraufhin durchliefen die Proben noch ein Tauchbad für 5 Minuten in Ethanol /Hexamethyldisilazan (50:50). Die Proben verblieben in Hexamethyldisilazan (100 %) bis dieses komplett verdampft war. Nun wurden die Proben auf die EM-Objektträger geklebt und mit Gold bedampft. Die Aufnahme der EM-Bilder erfolgte an der Universitätsklinik in Homburg.

2.2.5 Kultivierung von Hühnerembryonen

Zur Untersuchung der Eignung des Vogeleis für die Nutzung im Tissue Engineering sind Untersuchungen am Modellorganismus selbst unerlässlich. Für diese Arbeiten bieten sich aus verschiedenen Gründen zwei Modellorganismen an: Die Wachtel und das Huhn. Das Huhn scheint wegen besserer Handhabbarkeit geeigneter zu sein.

Standard Brutparameter

Für die Inkubation von Hühnerembryonen wurde, wenn nicht anders beschrieben, ein standardisiertes Inkubationsprotokoll verwendet. Die Inkubationstemperatur lag bei 37,5 °C und die RH bei 65 %. Die Wendung der Kulturen erfolgte um 30 ° alle 120 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 6 °/s. Die Inkubation wurde bis Tag 18 im Standardinkubator (Hemel) und bis zum Schlupf im Schlupfinkubator (Bruja) durchgeführt. Im Schlupfinkubator herrschte eine erhöhte RH von 80 %, eine Wendung wurde hier nicht durchgeführt. Die Parameter orientieren sich an eigenen Erfahrungen und den von Haque beschriebenen Werten [46].

Vorbereitung der Bruteier

Die Bruteier (*Gallus gallus domesticus*) wurden von LSL in Dieburg bezogen. Nach Erhalten der Bruteier wurden diese mit einem trockenen Tuch gereinigt, gewogen, mit einem Bleistift beschriftet, der Größe nach sortiert und im Kühlschrank bei 16 °C für mindestens 24 Stunden gelagert. Mit der Lagerung bei 16 °C wurde dem physiologischen Nullpunkt Rechnung getragen [40]. Die Fähigkeit der Keimscheibe die Entwicklung fortzusetzen, nimmt mit der Dauer der Lagerung durch Apoptose und Nekrose ab[38], weswegen die maximale Lagerdauer auf 14 Tage begrenzt wurde. Vor Inkubationsbeginn wurden die Bruteier zunächst aus dem Kühlschrank genommen und ruhten für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur.

In-ovo-Kultur von Hühnerembryonen nach Perry

Die Kultivierung von Hühnerembryonen in der Perry-Kultur (Abbildung 15) wurde analog der von Perry beschriebenen Kulturform III durchgeführt [82]. Die Präparation wurde so modifiziert, dass der Transfer von drei Tage alten Embryonen, aus ungeöffneten Bruteiern erfolgte. Alle Schritte wurden unter Anwendung steriler Arbeitstechniken durchgeführt. Als Kulturgefäße dienten unbefruchtete Eier, die 25 g

Material und Methoden

schwerer sein mussten als die Bruteier, deren Inhalt kultiviert werden sollte. Der Grund hierfür ist die Vermeidung des Kontaktes zwischen der abdeckenden Folie und dem Embryo. Schalen mit Rissen oder Einschlüssen wurden nicht verwendet. Nach einer Reinigung mit Bacillol wurde am stumpfen Ende ein 40 mm durchmessender Ring aufgesetzt und an dieser Kante eine Bleistiftmarkierung angebracht. Mit der elektrischen Säge wurde das Ei an der Markierung geöffnet und der Inhalt verworfen. Nach dem Öffnen wurde erneut auf Risse kontrolliert und defekte Schalen aussortiert. Um die Eischalenhäute vor dem Austrocknen zu schützen, wurde die Schale mit der Öffnung nach unten auf ein wassergetränktes Zellstofftuch gestellt.

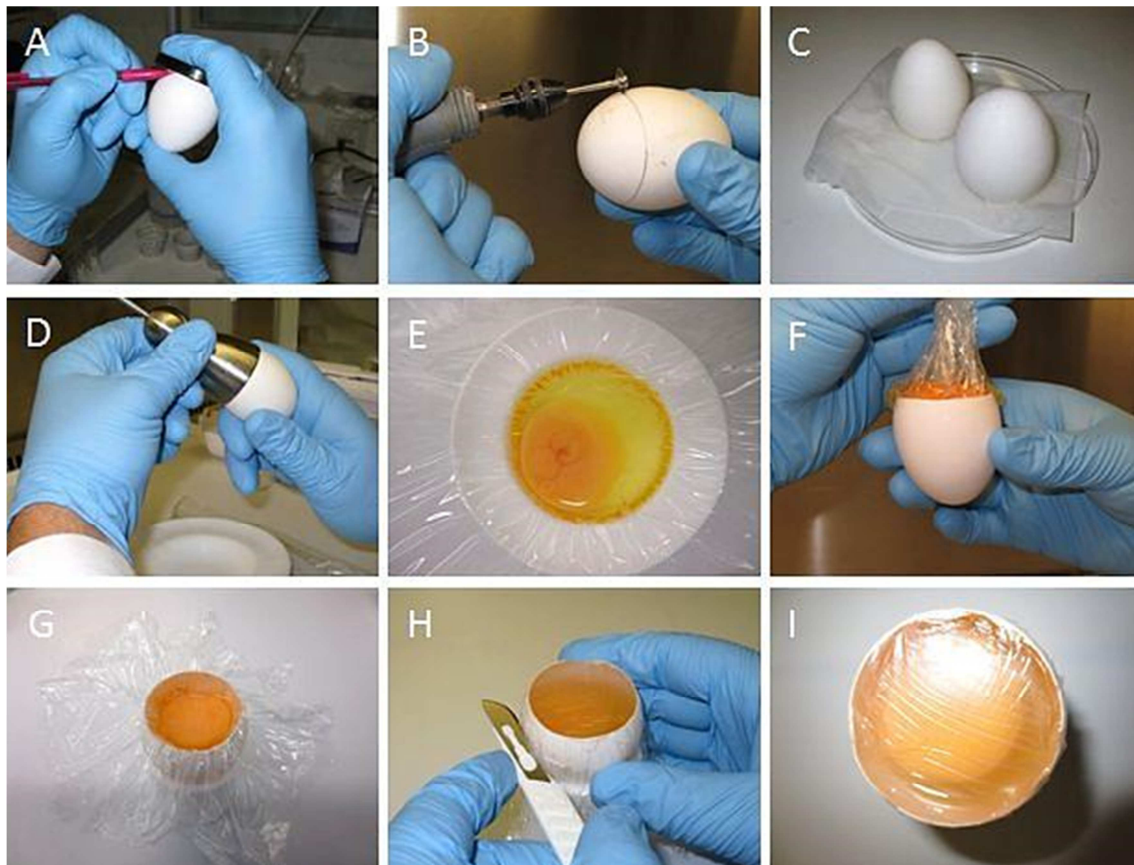


Abbildung 15: Die Präparation der Perry-Kultur A) Anzeichnen der Schnittlinie bei 40 mm am stumpfen Ende des Eies B) Öffnen des Fremdschaleneis mit der Elektrischen Säge C) Aufbewahrung der Fremdschalen auf feuchtem Zellstoff als Schutz vor Austrocknung D) Öffnen des Bruteis mittels Eierschalensollbruchstellenverursacher E) Unbeschädigter Embryo in Folie F) Überführen des Embryo in die Fremdschale G) Aufklappen der Folie zum anschließenden Herausziehen unter dem Embryo H) Verschließen der Kultur mit zwei Lagen Frischhaltefolie und Kürzen der überstehenden Enden I) Fertig präparierte Perry-Kultur

Die für 72 Stunden inkubierten Bruteier wurden unter sterilen Bedingungen mit einem Eierschalensollbruchstellenerzeuger am stumpfen Ende geöffnet und der Embryo so schonend wie möglich in eine mit Frischhaltefolie ausgelegte Teflonschale gegossen. In der Frischhaltefolie wurde nun über die weitere Verwendung der Embryonen entschieden. Hierzu wurden folgende Merkmale beurteilt: kugelige, runde Form des Dotters, Entwicklungsfortschritt des Embryos, eventuellen Fehlbildungen und Verletzungen (Blutungen). Verletzte oder ungeeignete Embryonen wurden verworfen. Bei geeigneten Embryonen wurde die Folie zu einem Sack geformt und dieser auf die Fremdschale aufgesetzt und eingebracht. Die Ecken der Frischhaltefolie wurden nun gelöst und die gesamte Folie herausgezogen. Mit einer 1 ml Einwegspritze wurde die Innenseite der Fremdschale mit 37 °C warmem Penizillin/Streptomycin (10000 U/ml/10000 µg/ml) angefeuchtet. Die Außenseite der Fremdschale wurde mit einem sterilen Wattestäbchen mit flüssigem Eiklar bestrichen. Ein etwa 7x7 cm großes Stück Frischhaltefolie wurde über die Öffnung gespannt und möglichst faltenfrei an den Rändern heruntergezogen. Eine weitere Schicht Eiklar wurde am oberen Rand der Schale aufgetragen und eine zweite Schicht Frischhaltefolie über die Öffnung gespannt. Etwa 7 mm unter dem Rand wurde die Frischhaltefolie mit einem Skalpell abgeschnitten. Die Enden der Folie wurde glatt gestrichen und die Perry-Kultur zur weiteren Inkubation in den Brutschrank gebracht.

Die weitere Inkubation erfolge nach Standardprotokoll. An Tag 19 wurde mit einer Kanüle (20 G) ein Loch in die Frischhaltefolie gestoßen. Ein weiteres Loch wurde an Tag 20 eingefügt. An Tag 21 wurde die Frischhaltefolie vollständig entfernt, um den Schlupf zu ermöglichen.

2.2.6 Technische Verfahren

Die Notwendigkeit zur Modifikation von Oberflächen wurde während der Untersuchungen von Kultivierungssystemen für den Hühnerembryo notwendig. Mit verschiedenen technischen Verfahren wurden Oberflächen und Strukturen beschichtet, um Kultivierungsbehälter zu optimieren.

Beschichtung mit Proteinlösungen

Zur Beschichtung von künstlichen Kulturbedältern wurden verschiedene Proteinlösungen wie FKS, Hühnerserum und Eiklar verwendet. Die Strukturen wurden im Vorfeld der Beschichtung gründlich gereinigt und autoklaviert. Die Proteinlösungen wurden unter sterilen Bedingungen in die Kulturbedälter gefüllt und für 24 Stunden darin belassen. Nach der Einwirkphase wurden die Lösungen entfernt und die Behälter in steriler Umgebung getrocknet.

Beschichtungen mit Sigmacote®

Die Strukturen wurden vor der Beschichtung gereinigt, getrocknet und autoklaviert. Die zu beschichtende Oberfläche wurde mit Sigmacote® benetzt und überschüssige Lösung entnommen. Die benetzten Strukturen wurden im Trockenschrank bei 100 °C für 30 Minuten getrocknet. Vor dem Autoklavieren wurden die Strukturen mit destilliertem Wasser gespült, um auftretende Nebenprodukte zu entfernen.

Beschichtung mit Med10-6640

Im Vorfeld der Beschichtung wurden die Strukturen gründlich gereinigt und autoklaviert. Die sauberen und trockenen Formen wurden in einem Tauchverfahren in die entgaste und gründlich gemischte Silikonmischung (Mischungsverhältnis 1:1 (w/w)) getaucht und anschließend für 5 Minuten zum Abtropfen aufgehängt. Danach wurden sie für 15 Minuten im Vakuumschrank (6 mbar) bei 40 °C getrocknet. Bei mehrschichtigen Beschichtungen wurde der Prozess wiederholt und eine Trocknung für 30 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte ein stufenweiser Aushärtungsprozess, bei dem zunächst 45 Minuten bei 75 °C und anschließend für zweieinhalb Stunden bei 150 °C das Silikon vernetzt wurde. Die heißen Formen wurden über Nacht abgekühlt und vor der Verwendung gewaschen und autoklaviert.

Beschichtung mit Med6015

Die Strukturen wurden im Vorfeld der Beschichtung gründlich gereinigt und autoklaviert. Die sauberen und trockenen Formen wurden in einem Tauchverfahren in die entgaste und gründlich gemischte Silikonmischung (Härter zu Monomer 1:10 (w/w)) getaucht und anschließend für fünf Minuten zum Abtropfen aufgehängt. Danach wurden sie für 15 Minuten im Trockenschrank bei 80 °C angetrocknet. Bei

mehrschichtigen Prozessen wurden die Tauchprozesse und die Trocknung wiederholt. Nach der letzten Trocknung wurde die Aushärtung bei 80 °C für 45 Minuten vervollständigt. Formen wurden über Nacht abgekühlt bevor sie autoklaviert und weiter verwendet wurden.

Kontaktwinkelmessungen

Zur Beurteilung der Hydrophobizität von festen Materialien wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Der Kontaktwinkel zwischen der Flüssigkeit und dem Feststoff wird durch die Wechselwirkung an der Kontaktfläche der beiden Substanzen bestimmt. Aus dem entstehenden Kontaktwinkel lassen sich bei Kenntnis der Eigenschaften der Flüssigkeit Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Feststoffes, wie z.B. die Oberflächenenergie, ziehen. Zur Messung der Kontaktwinkel wurde Wasser als Flüssigkeit genutzt. Bei kleinen Kontaktwinkeln wird eine Oberfläche als hydrophil, bei großen Winkeln als hydrophob bezeichnet. Mit einem Analysegerät (Dataphysics OCA20 Contact Angle System) wurde ein Tropfen von 4,5 µl auf den Festkörper aufgetragen. Dieser Tropfen wurde zeitnah mit der Kamera dokumentiert und mit der Software beiderseitig der Kontaktwinkel gemessen. Die Bestimmung der Oberflächenenergie erfolgt in der OCA20 Software mit der Equation of the state Methode [108].

2.3 Entwicklungen

Im Laufe der Arbeit mussten eine Vielzahl sehr komplexer technischer Systeme entwickelt und zeitnah aufgebaut werden.

2.3.1 Deckelsystem für In-ovo-Kulturen

Auf Grundlage des Perry-Systems zur Kultivierung von Hühnerembryonen wurde ein Deckelsystem zur Optimierung der Dokumentation und der Manipulation entwickelt, da das Perry-System in diesen Punkten als ungenügend empfunden wurde. Durch Reflexionen und Faltenbildung verhindert die Frischhaltefolie des Perry-Systems die Manipulation sowie eine qualitativ hochwertige Dokumentation. Hierfür muss die

Perry-Kultur im sterilen Umfeld geöffnet und anschließend wieder verschlossen werden.

Aufbau des Deckelsystems

Die Entwicklung und Konstruktion des Deckelsystems (Abbildung 16) erfolgte am IBMT durch ein interdisziplinäres Team aus Naturwissenschaftlern und Technikern, die den Autor unterstützten. Die Lösung der Problematik wurde in einem mechanisch festen Deckelsystem mit einem dünnen Glas als Dokumentationsfenster gesucht. Das entwickelte System besteht aus einem Kunststoffring, der an der Fremdschale befestigt wird und dem Deckel, der die Kultur verschließt. Der Deckel wird mit drei Schrauben auf dem Ring fixiert. Die Befestigung des Ringes an der Eierschale wird durch eine Klebung erreicht. Der über den Ring hinausragende Teil des Eies wird nach Aushärten des Klebstoffes mit einer elektrischen Säge entfernt. Der weitere Präparationsablauf verlief analog der Präparation des Perry-Systems.

Für die beiden Anwendungsfelder Dokumentation und Manipulation wurde jeweils ein eigener Deckel entwickelt. Der Deckel für Dokumentationszwecke hat eine niedrige und flache Form (7 cm x 1 cm). Er besteht aus dem Unterteil, dem Dichtungsgummi, der Glasscheibe, dem Leiterring und dem Oberteil. Die Glasscheibe wird von oben durch den Leiterring bedeckt und im Unterteil des Deckels fixiert. Der Leiterring ist mit zwei Leiterbahnen versehen, die über eine Buchse kontaktiert werden können. Eine Leiterbahn ist an einen pt100-Temperatursensor angeschlossen, die andere an die Glasscheibe, welche mit Goldkontakten versehen ist.

Der Manipulationsdeckel ist ähnlich aufgebaut wie der Dokumentationsdeckel. Er besteht aus dem Unterteil, dem Kugelgelenk, der Glasscheibe, dem Leiterring und dem Oberteil. Die Form des Deckels (7 cm x 5 cm) ist wegen des Platzbedarfes eines in das Kugelgelenk einzusetzenden Manipulators erhöht. Um mit einem Manipulator jede Stelle auf der Oberfläche der Kultur erreichen zu können, musste das Unterteil zu einem Tubus erweitert werden. In ihm sitzt seitlich das Kugelgelenk. Für den Einsatz im Manipulationsdeckel eignen sich Manipulatoren wie Spritzen, Pipetten oder Mikrodispenser. Verwendbar sind Manipulatoren mit einem Durchmesser <0,8 cm.

Dieser kann durch Einsätze angeglichen werden. In vielen Experimenten hat es sich als äußerst hilfreich erwiesen, mehrere verschiedene Manipulatoren zur Verfügung zu haben, zum Beispiel eine Hamilton-Spritze zum Einbringen von Zellen und eine Pipette zum Einbringen von Kulturmedium.

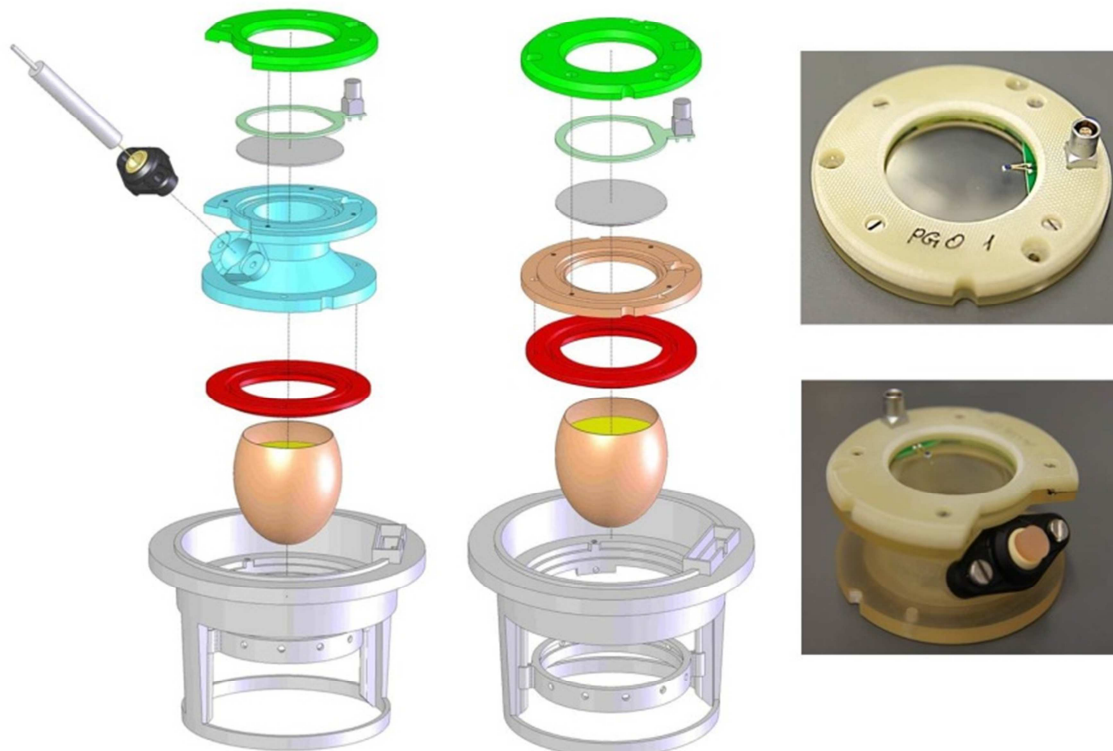


Abbildung 16: Deckelsystem für In-ovo-Kulturen. Der Kunststoffring (rot) bildet die Verbindung von Eierschale und Deckel. Links: Der Manipulationsdeckel bestehend aus Unterbau(hellblau), Glasdeckel (grau), Leiterring (hellgrün), Oberteil (grün) und Kugelgelenk (schwarz). Mitte: Der Dokumentationsdeckel bestehend aus Unterbau (orange), Glasdeckel (grau), Leiterring (hellgrün) und Oberteil (grün). Rechts oben: Dokumentationsdeckel mit pt100-Temperatursensor. Rechts unten: Manipulationsdeckel ohne Manipulator

Kondensationsschutz des Deckelsystems

Wird eine In-ovo-Kultur aus der Inkubationsumgebung auf Raumtemperatur gebracht, tritt an den abkühlenden Grenzflächen der Kultur Kondensation auf. Die Vermeidung dieser Kondensation ist eine Grundbedingung für eine gute Dokumentation. Um ein Beschlagen zu verhindern, erscheint die Regelung der Temperatur der Glasscheibe als

Material und Methoden

die zielführendste Lösung. Es wurden zwei Heizungen zur Temperierung des Deckel-Deckelglases entwickelt und in das Deckelsystem integriert.

Die erste Heizung arbeitet nach dem Prinzip eines Warmluftgebläses. Ein Heizlüfter wurde in einem Abstand von 6 cm seitlich über der Glasscheibe des Deckels angebracht, um die Dokumentation nicht zu behindern. Die Soll-Temperatur der Glasscheibe wird in einem Steuerungsprogramm vorgegeben. Dieses Programm wurde im IBMT mit C# (Visual Studio, Microsoft) programmiert. Neben weiteren Funktionen misst das Programm über den Temperatursensor auf dem Deckel die aktuelle Temperatur der Glasscheibe und regelt diese über das Heizelement nach. Über diesen Regelkreis wird die Glastemperatur konstant gehalten.

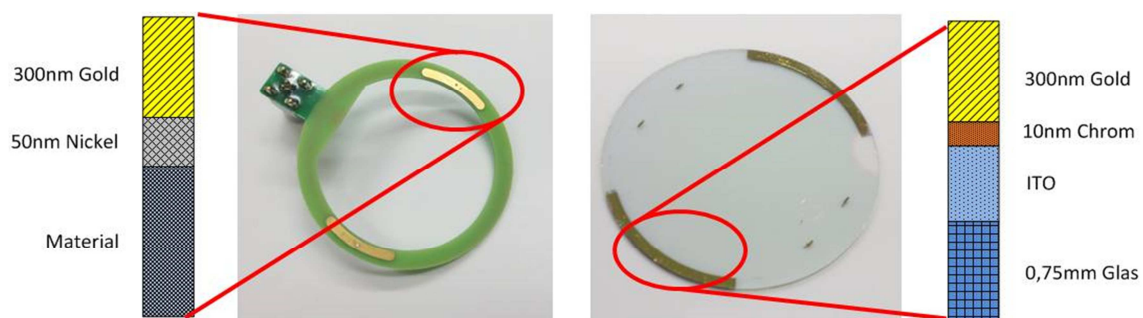


Abbildung 17: Hauptkomponenten der ITO-Heizung im Deckelsystem. Links: Beschichtung des Leitungsringes mit Nickel und Gold zur Kontaktierung. Rechts: Beschichtung des ITO-Glases mit Chrom und Gold zur besseren Kontaktierung

Die zweite Heizung nutzt die gleiche Steuersoftware wie die bereits beschriebene Warmluft-Heizung. Sie besteht aus einer dünnen Schicht auf der Glasscheibe, die elektrisch leitend ist und sich beim Anlegen einer Spannung erwärmt. Bei dem Material handelt es sich um ein optisch transparentes Indium-Zinnmischoxid (ITO), das 0,7 mm dick auf der ganzen Außenseite des Glases aufgebracht ist. An den Rändern des Glases erfolgt die Kontaktierung der ITO Schicht mit dem Leiterring (Abbildung 17). Sowohl auf der ITO-Schicht als auf dem Leiterring sind Goldkontakte (300 nm) zur besseren Kontaktierung angebracht. In der Heizphase liegt eine einstellbare Spannung (3-12 V) an dem ITO an, dieses erwärmt sich und verhindert so die Kondensation.

2.3.2 Inkubator für eine In-ovo-Kultur

Für diese Arbeit ist die Kultivierung von Hühnerembryonen in den jeweils modifizierten Naturei-Systemen ein zentraler Punkt. Hierzu werden, ähnlich der Brutschränke in der In-vitro-Zellkultur, spezielle Inkubatoren benötigt. Nach eingehender Beschäftigung mit handelsüblichen Inkubatoren für Vogeleier musste festgestellt werden, dass diese für wissenschaftliches Arbeiten nur bedingt geeignet sind. Diese Inkubatoren sind dazu ausgelegt, möglichst viele Eier parallel zu bebrüten. Das erfolgt durch eine enge Positionierung der Eier. Eine Dokumentation der Eier während der Inkubation ist nicht vorgesehen. Die Möglichkeit andere Parameter als die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit einzustellen, besteht fast nie. Außerdem besteht keine Art von Automatisierung, jede Änderung der Parameter muss manuell erfolgen. Diese Funktionen sind für die notwendigen Untersuchungen sehr hilfreich. Daher wurde ein Inkubator für Vogeleier, der die genannten Anforderungen erfüllt, entwickelt, aufgebaut und bis zur Nutzbarkeit hin optimiert. Die Entwicklung erfolgte am IBMT durch ein interdisziplinäres Team aus Naturwissenschaftlern und Technikern, die den Autor unterstützten. Die Konstruktion erfolgte als Auftragsarbeit durch die Firma Key Sciences Engineering in Blies-Ebersing, Frankreich. Nachträgliche Optimierungen wurden am IBMT umgesetzt.



Abbildung 18: Verschiedene Versionen des Inkubators für eine In-ovo-Kultur und dazugehöriger Abdeckungen. Links: Erster Prototyp des Inkubators. Mitte: Finale Form des Gehäuses. Rechts: Vier unterschiedliche Abdeckungen

Der entwickelte Inkubator wurde aus zwei Teilen aufgebaut. Der untere Teil sollte die Funktion der Inkubation übernehmen und der obere Teil die für die Dokumentation nötigen Komponenten enthalten. Der Inkubator durchlief mehrere Phasen der Optimierung. Es wurden zwei Prototypen (Abbildung 18) entwickelt, die den Ansprüchen nicht genügten und sukzessiv überarbeitet werden mussten. Die Einzelteile durchliefen insgesamt drei Prototypphasen. Beispielsweise wurde der innere Deckel dreimal angepasst, um die Positionierung der Kamera und damit die Qualität der Dokumentation zu erhöhen. Schatten, Reflexionen an der Glasscheibe des Deckels und ungleichmäßige Beleuchtung waren die schwerwiegendsten Probleme, die gelöst werden mussten. Im Folgenden wird die Endversion des Inkubators (Abbildung 19 und 20), wie er für experimentelle Untersuchungen verwendet wurde beschrieben.

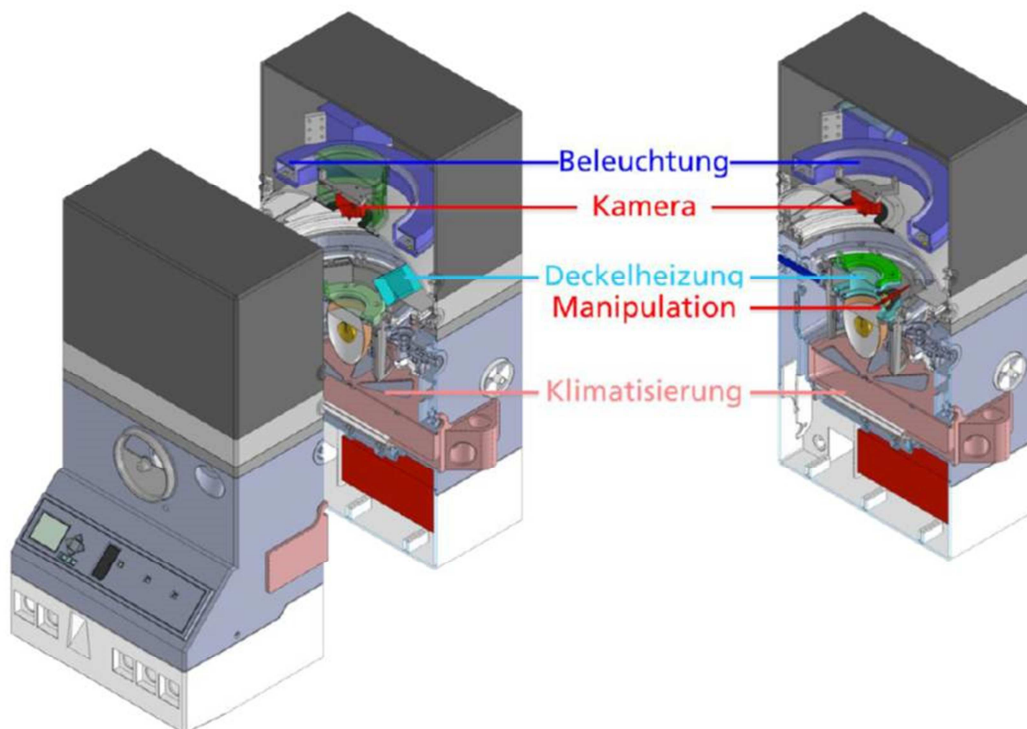


Abbildung 19: Schemazeichnung des Inkubators für eine In-ovo-Kultur. Positionierung der einzelnen Funktionskomponenten im Inkubator mit Deckelsystemen versehenen In-ovo-Kulturen

Das Gehäuse wurde im 3D-Lasersinterverfahren mit in den Abmaßen 80x50x60 cm hergestellt. Es besteht aus dem Gerätegehäuse sowie dem inneren und dem äußeren Deckel. Der untere Teil des Inkubators beinhaltet die Batterie, die Steuereinheit, das Wasserreservoir, die Heizelemente, die Wendevorrichtung und den Inkubationsraum. Nach oben gegen den inneren Deckel wird der Inkubationsraum durch eine flexible Sperrmembran abgetrennt. Der innere Deckel beinhaltet die Dokumentations- und die Beleuchtungseinheit. Der äußere Deckel dient als Abdeckung zum Schutz der Kultur. Die Steuerung der Klima- und Bewegungsparameter erfolgt mit einer LOGO![®] Steuerung von Siemens, die beide Heizlüfter, den Motor der Wendeachse und die Heizung des Wasserreservoirs verwaltet. Temperatur, Luftfeuchtigkeit und das Wendeprogramm können hier frei eingestellt werden. Auf einer SD-Karte werden die Klimaparameter aufgezeichnet. Temperatur und Luftfeuchtigkeit werden mit einem Kombinationssensor (SHT75DK, Driesen+Kern GmbH, Bad Bramstedt) gemessen, der an die LOGO![®] gekoppelt und im Inkubationsraum angebracht ist.

Der Inkubator verfügt über einen Batteriesatz, der den Minimalbetrieb (Inkubationsklima und Wendungen) für acht Stunden ohne Netzspannung ermöglicht. Die Temperatur wird mit zwei Heizlüftern auf der Vorder- und der Rückseite des Inkubationsraumes erzeugt. Die Luftfeuchtigkeit wird über eine Heizplatte unter dem Wasserreservoir erzeugt. Das Wasserreservoir fasst 600 ml Wasser und ist für die Befeuchtung des Inkubationsraumes mit 65 % RH für 5 Tage ausgelegt. Der Inkubationsraum kann über drei Rosetten (zwei 4 cm durchmessende seitlich, eine 6 cm durchmessende an der Stirnseite) belüftet werden. Zur Überwachung der Sauerstoffkonzentration im Inkubationsraum ist ein O₂-Sensor in das Gehäuse eingelassen, welcher mit einem externen Messgerät ausgelesen werden kann.

Die Position der In-ovo-Kultur befindet sich in einem Korb, der zentral im Inkubationsraum angebracht ist. Der Korb ist auf einer Schwenkachse gelagert, über welche die Wendung erfolgt. Diese wird von einem Elektromotor angetrieben, der in seiner Geschwindigkeit über einen Spannungswandler einstellbar ist. Es besteht außerdem die Möglichkeit, den Korb um die eigene Achse zu drehen. Über die frontal angebrachten Bedienelemente ist es möglich, jederzeit den Schwenkwinkel der Achse zu ändern, die Kultur zu drehen oder sämtliche Bewegungen zu blockieren.

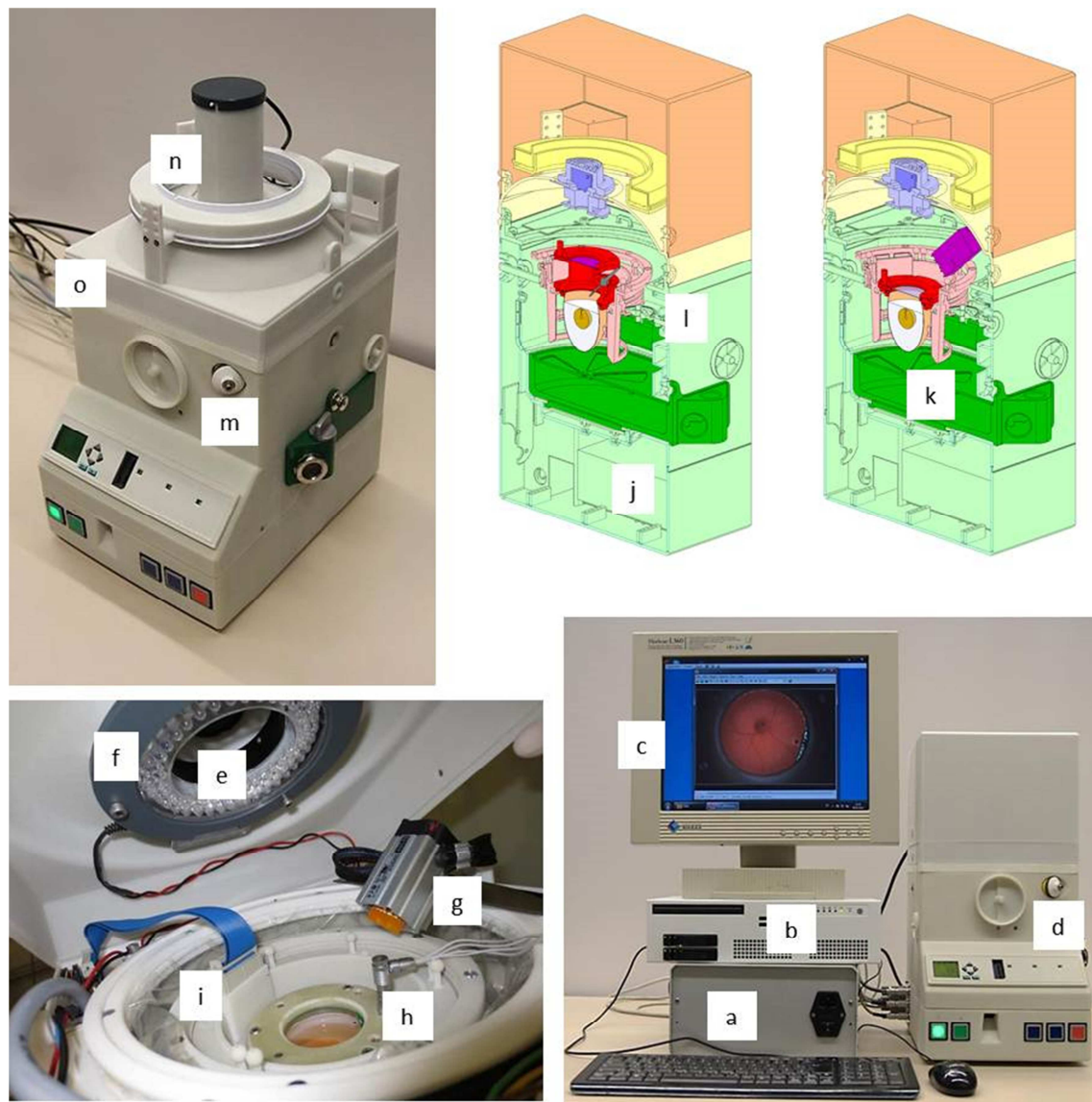


Abbildung 20: Das automatisierte Inkubationssystem für eine In-ovo-Kultur in seiner finalen Version. a) Steuereinheit für Beleuchtung, b) Rechner zur Steuerung der Dokumentation, c) Monitor, d) Inkubator, e) Objektiv der Kamera, f) LED Ring zur Beleuchtung, g) Warmluftgebläse zur Beheizung des Deckels, h) Anschluss des Temperatursensors auf der Glasscheiben und der ITO-Heizung, i) Klimasperre des Inkubationsraums zur Kamera, j) Akkumulator, k) Wasserreservoir zur Erzeugung der Luftfeuchtigkeit, l) Wendevorrichtung, m) Sauerstoffsensor, n) Halterung der Kamera, o) innerer Deckel

Die Dokumentationseinheit besteht aus einer CCD-Kamera (μ Eye XS, IDS Imaging Development Systems), die direkt oberhalb der In-ovo-Kultur angebracht ist. Die Beleuchtungseinheit wurde außerhalb des Zwischendeckels angebracht. Durch das Material des Zwischendeckels wird das Licht der ringförmigen LED-Leuchte gestreut und sorgt somit für eine gleichmäßige Ausleuchtung der Kultur. Das Gewicht des

vollständigen Inkubators beträgt mit Kultur und gefülltem Wasserreservoir 6 kg und ist damit von einer Person bequem zu tragen. Die elektrische Absicherung gegen Stromausfälle wurde durch den Einsatz einer Einheit zur unterbrechungsfreien Stromversorgung sichergestellt.

2.3.3 Inkubator für mehrere In-ovo-Kulturen

Der Inkubator für eine In-ovo-Kultur wurde mit dem Fokus auf eine möglichst lückenlose und hochqualitative Dokumentation entwickelt. Sein größter Nachteil liegt darin, nur eine Kultur aufnehmen zu können. Daher war es notwendig, einen zweiten Inkubator zu entwickeln und aufzubauen, der mehrere In-ovo-Kulturen gleichzeitig bebrüten und dokumentieren kann, aber Vorteile in punkto Dokumentation und Automation gegenüber den kommerziell erhältlichen Inkubatoren besitzt. Die Entwicklung des Inkubators erfolgte am IBMT durch ein interdisziplinäres Team aus Naturwissenschaftlern und Technikern, die den Autor unterstützten. Die Konstruktion erfolgte als Auftragsarbeit durch die Firma LIS (Life Imaging Services) in Basel, Schweiz. Nachträgliche Optimierungen wurden am IBMT umgesetzt. Auch bei diesem Inkubator waren zahlreiche Optimierungen, besonders bei der Automatisierung der Dokumentation, notwendig. Die folgende Beschreibung bezieht sich nur auf die finale, in Experimenten verwendete Version des Inkubators.

Der Inkubator (Abbildung 21 und 22) wurde modular aufgebaut und besteht aus einer zweischichtigen Inkubationskammer, der Dokumentationseinheit, dem Befeuchtungssystem, der Heizeinheit, der Achsensteuerung und dem Steuerungsrechner. Die innere Inkubationskammer besteht aus einer Schublade, die auf zwei motorisierten Achsen montiert ist und somit in ihrer x- und y-Position frei beweglich ist. Die Kulturen sitzen auf einer von fünf Schienen, die synchron durch einen Motor gewendet werden können. In jeder Schiene befinden sich fünf Aufnahmen für In-ovo-Kulturen. Diese sind über verschiedene Einsätze an die individuelle Größe der jeweiligen Kultur anpassbar. Das Klima der Kammer wird von zwei Faktoren bestimmt: Die relative Luftfeuchtigkeit wird durch die Zuführung von feuchter Luft aus dem Befeuchtungssystem in die innere Inkubationskammer eingestellt. Ein in die Rückwand eingelassener Sensor misst die Luftfeuchtigkeit. Die Temperatur in der

inneren Inkubationskammer wird indirekt durch die geregelte Temperatur der äußeren Inkubationskammer bestimmt. Nach oben wird die innere Inkubationskammer von einer lichtundurchlässigen Kunststoffplatte abgedichtet.

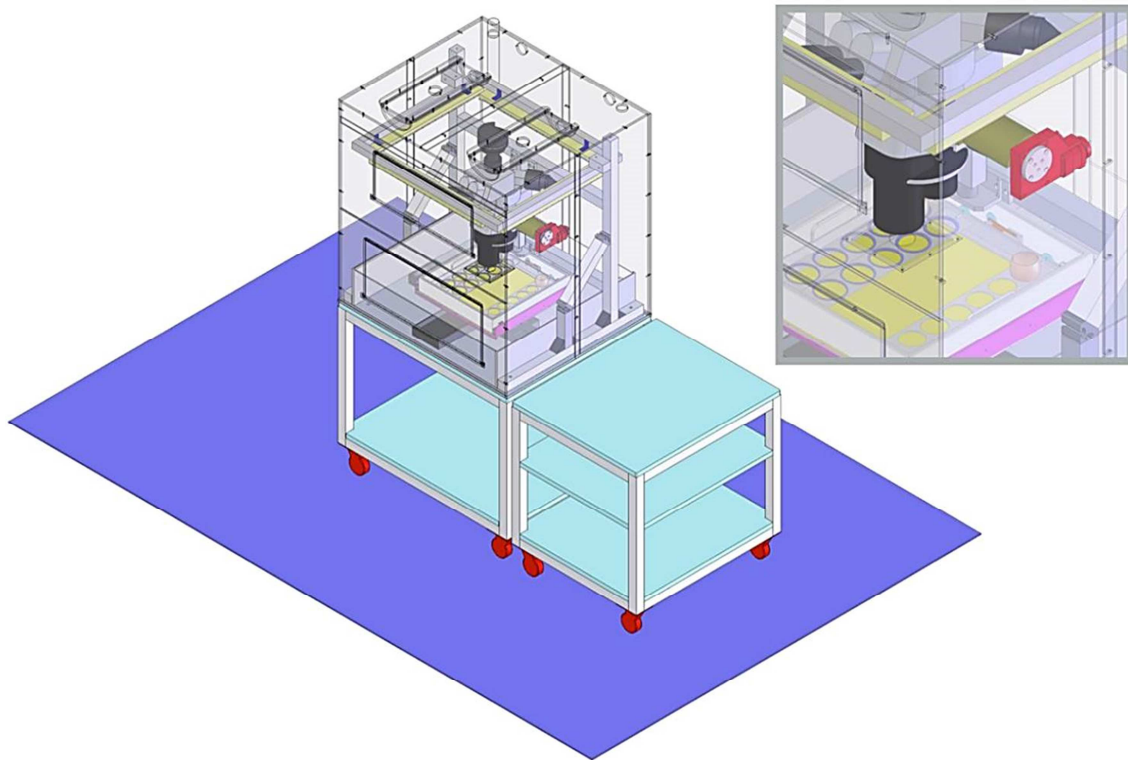


Abbildung 21: Schemazeichnung des Inkubators für bis zu 24 In-ovo-Kulturen. Zur Übersichtlichkeit wurden die Achsensteuerung und der Rechner weggelassen. Die Vergrößerung zeigt eine Detailaufnahme der Inkubationsschublade

Um keine Kultur der ständigen Beleuchtung auszusetzen, ist die linke hintere Position ausgespart und als Ruheposition unter der Dokumentationseinheit festgelegt. Nur zu Dokumentationszwecken oder bei manueller Positionswahl werden die 24 frei wählbaren Positionen unter der Dokumentationseinheit positioniert. Die äußere Inkubationskammer ist aus Plexiglas gefertigt und umschließt die innere Inkubationskammer vollständig. Sie wird über zwei Schläuche von der Heizeinheit mit Warmluft versorgt. Durch diese Temperierung wird indirekt die innere Inkubationskammer mit beheizt. Die Temperatur wird durch einen Sensor in der äußeren Inkubationskammer geregelt. Zur Beladung der inneren Inkubationskammer und der Justierung des Dokumentationssystems sind zwei Klappen an der Stirnseite der

Kammer angebracht. In der äußeren Inkubationskammer befindet sich die Grundplatte, auf der das Stativ für die Dokumentationseinheit und die Beleuchtung angebracht ist.

Die gesamte Einheit ist auf einem angepassten Rollwagen aufgebaut, der eine gewisse Mobilität ermöglicht. Auf ihm sind ebenfalls der Kompressor, die Heizeinheit, die Befeuchtungseinheit sowie die Achsensteuerung untergebracht. Die Dokumentationseinheit ist an einem Gestänge befestigt. Es ist so konstruiert, dass entweder mit einer CCD-Kamera (Sony XCG 5005) oder einem Binokular (Olympus SZX9) dokumentiert werden kann. Die Dokumentationseinheit ist statisch angebracht. Zur Dokumentation werden die Proben mit den Achsen der inneren Inkubationskammer unter die Kamera oder das Binokular gefahren. Zur Fokussierung in z-Richtung ist es möglich, die Kamera oder das Binokular auf einer Achse manuell auszurichten. Die Kamera bietet den Vorteil, hochauflösende Übersichtsbilder zu generieren. Das Binokular ist hingegen in der Lage, Aufnahmen in hoher Vergrößerung aufzunehmen sowie Fluoreszenzsignale zu detektieren. Dies stellt eine Erweiterung des Dokumentationsspektrums gegenüber dem Inkubator für eine In-ovo-Kultur dar.

Das Befeuchtungssystem besteht aus dem Kompressor, der Steuereinheit und dem Befeuchtungsrohr. Der Kompressor erzeugt einen für die Steuereinheit notwendigen Druck von 1,2 bar. Die Steuereinheit kontrolliert den gesetzten Wert der Luftfeuchtigkeit über den Sensor in der inneren Inkubationskammer. Bei Bedarf wird die Flussrate der Luft durch das Befeuchtungsrohr erhöht und so die RH angehoben. Je nach Anforderung ist es möglich, der Luft bis zu zwei Gase in gewünschten Konzentrationen zuzumischen. Begrenzungen für Flussraten und Sollwerte für Feuchtigkeit und Gaszusammensetzung können frei eingestellt werden. Die Luft wird durch einen Zerstäuber aus Keramik, am Boden des Befeuchtungsrohrs, gepresst. Die dabei entstehenden Blasen sättigen sich auf dem Weg an die Oberfläche mit Feuchtigkeit. Am oberen Ende ist ein Schlauch angebracht, der die angefeuchtete Luft in die innere Inkubationskammer leitet. Das Befeuchtungssystem wurde von der Firma LIS (Basel, Schweiz) bezogen. Die Füllung des Befeuchtungsrohrs für die Befeuchtung der inneren Kammer mit 65 % RH ist so ausgelegt, dass ohne Nachfüllen ein Zeitraum von 21 Tagen überbrückt werden kann.

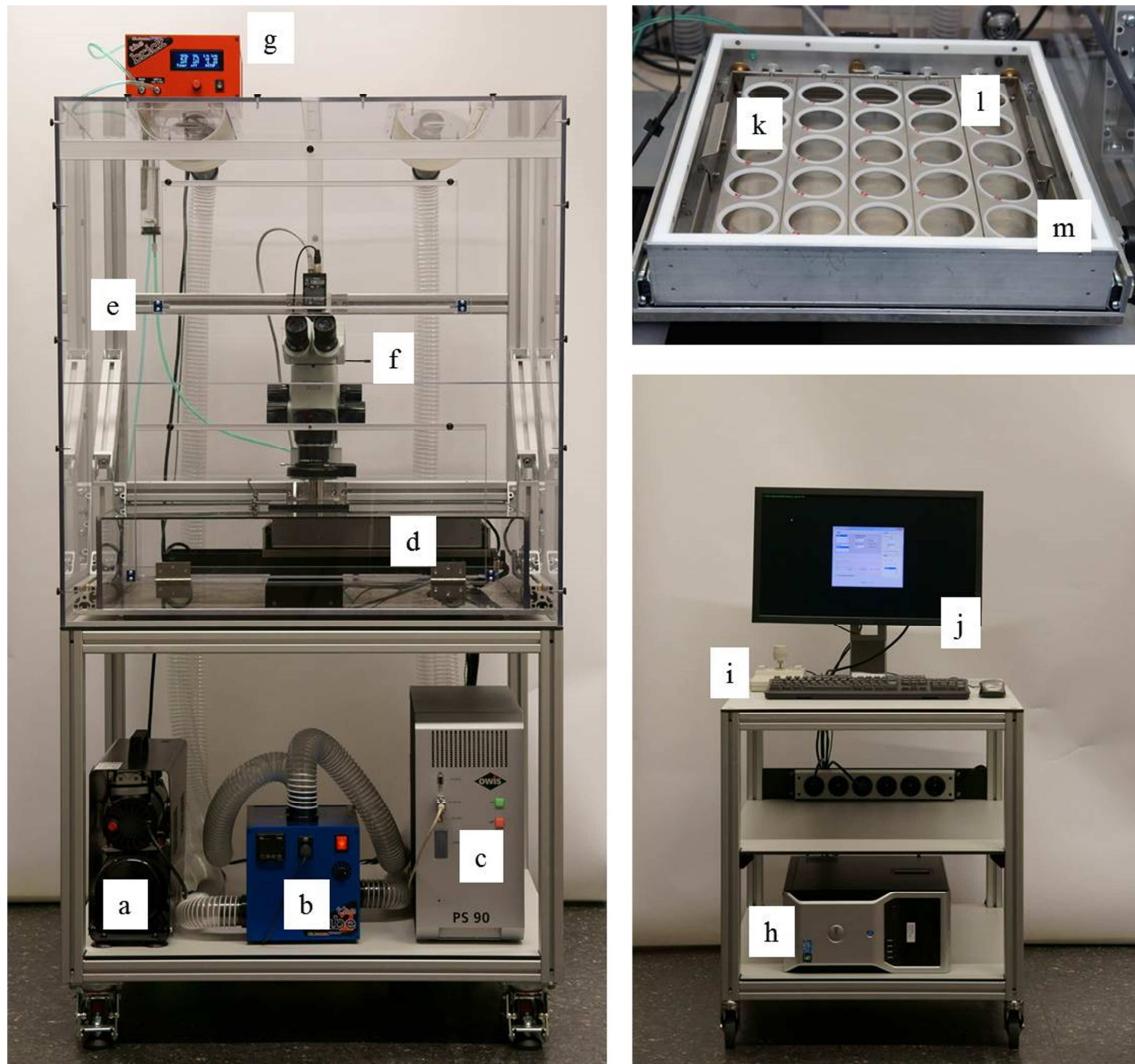


Abbildung 22: Das automatisierte Inkubationssystem für bis zu 24 In-ovo-Kulturen. Links: Gesamtansicht des Systems ohne Steuerungsrechner a) Kompressor für die Erzeugung befeuchteter Luft b) Heizeinheit zur Temperierung der Inkubationskammer c) Steuereinheit der Achsen d) verfahrbare Inkubationsschublade mit Wendevorrichtung e) Äußerer Inkubationsraum f) Binokular mit Kamera zur Dokumentation g) Steuergerät zur Einstellung der Luftfeuchtigkeit in der Inkubationsschublade. Rechts unten: Steuerrechner h) Rechner zur Steuerung der Dokumentation, Beleuchtung und Positionierung i) Joystick zur manuellen Positionierung der Kulturen j) Monitor. Rechts oben: Detailaufnahme der Inkubationsschublade k) Wendevorrichtung für bis zu 24 In-ovo-Kulturen l) Sensor zur Messung der Luftfeuchtigkeit m) Abdichtung gegen die Abdeckplatte

Die Heizeinheit befindet sich unter der Inkubationskammer. Hier wird ein Warmluftstrom erzeugt, der über zwei Schläuche in den oberen Teil der Inkubationskammer geleitet wird. Die Luft durchläuft einen Staubfilter, bevor sie in den Raum geleitet wird. Über einen Sensor, der im unteren Teil der äußeren Inkubationskammer befestigt ist, wird die Wärmezufuhr geregelt. Die Regelung erfolgt in der Heizeinheit, welche ebenfalls von der Firma LIS (Basel, Schweiz) geliefert

wurde. Die Achsensteuerung PS90 der Firma Owis (Staufen, Deutschland) befindet sich unter dem System und übersetzt vom Steuerprogramm ausgegebene Befehle in für die Achsen verwertbare Form. Für die Wendeachse wurde, in vorangegangenen Experimenten begründet, eine Wendegeschwindigkeit von 0,6 °/s gewählt. Die Kulturen werden bis zu einem Winkel von 15 ° von der Waagerechten aus gekippt. Die Werte für Winkelbegrenzung sowie Wendegeschwindigkeit sind bei Bedarf einstellbar.

Der Computer steuert die Bewegung der Achsen, die Steuerung der jeweiligen Kamera und die Verarbeitung der Daten. Die elektrische Absicherung gegen Stromausfälle wird durch eine Einheit zur unterbrechungsfreien Stromversorgung (USV) sichergestellt. Der Computer inklusive des Monitors, der Eingabegeräte und der Stromversorgung ist auf einem separaten Rollwagen untergebracht.

Vor Vollendung der experimentellen Arbeiten, aber erst nach Fertigstellung der beiden selbst entwickelten Inkubatoren, wurde die Existenz eines Inkubationssystems für Hühnereier bekannt, welches für wissenschaftliche Arbeiten ausgelegt ist. Dieses Arguscope[®] genannte Gerät ist in der Lage bis zu neun In-ovo-Kulturen zu bebrüten und verfügt über eine Dokumentationseinheit [4]. Wäre die Existenz dieses Systems früher bekannt gewesen, wäre die Entwicklung und Evaluierung der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen neuen Inkubatoren wahrscheinlich nicht notwendig gewesen. Es muss an dieser Stelle allerdings betont werden, dass während der Arbeiten an den Inkubatoren wichtige Hinweise zur Handhabung und Kultivierung von Hühnerembryonen gewonnen wurden, die sehr hilfreich für die weiteren Arbeiten dieser Dissertation waren und beim Erwerb eines Fremdproduktes nicht zum Tragen gekommen wären. Außerdem wurden mit den neuen Inkubatoren wertvolle Werkzeuge für die wissenschaftliche Arbeit mit Hühnerembryonen geschaffen, die dem Arguscope[®] in vielen Belangen, wie etwa der möglichen Menge an Kulturen, überlegen sind.

3 Ergebnisse

Die embryonale Entwicklung des Huhns in seinem Ei zeigt all die Probleme, die bei der Generierung von Geweben bisher in den bekannten In-vitro-Kultursystemen auftreten, nicht. Problemlos wächst es von der diffusionsversorgten Keimscheibe zu einem dreidimensionalen Organismus mit funktionalem Gefäßsystem heran. Der Hühnerembryo wurde daher als Modellorganismus für die Untersuchungen in dieser Dissertation gewählt.

Das Basisproblem der In-vitro-Kultivierung von Geweben und des Tissue Engineerings allgemein bildet die Beschränkung der Versorgung von Zellen mit Nährstoffen über Diffusion. Der Anschluss von Fremdgewebe an die Blutgefäße des Embryos mittels Angiogenese wird als Schlüssel zur Lösung des Problems angesehen. Zunächst musste die für diese Experimente notwendige Basis geschaffen werden. Hierzu zählen das Auffinden einer geeigneten Form der Kultivierung, die Möglichkeit der Manipulation sowie deren Dokumentation.

3.1 Technische Entwicklungen

Unter der Kultivierungsform wird hier die Art und Weise der Kultivierung des Hühnerembryos, hauptsächlich das Kulturgefäß, verstanden. Zunächst wurden mehrere in der Literatur beschriebene Kultivierungsformen etabliert und auf ihre Eignung hin beurteilt. Die Beurteilung ergab, dass die kommerziell verfügbaren Geräte nicht den Anforderungen an ein modernes Setup entsprechen, da sie für das Ausbrüten von Vogeleiern konzipiert sind und nicht auf deren Dokumentation und Manipulation. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von technischen Entwicklungen notwendig, um völlig neue Hightech Systeme zu entwickeln und aufzubauen. Diese Entwicklungen bilden die Grundlage für die folgenden Arbeiten.

3.1.1 Evaluation des Deckelsystems für In-ovo-Kulturen

Zunächst wurde nach einer geeigneten, stabilen und handhabbaren Kultivierungsform für den Hühnerembryo gesucht. Die Kultivierungsformen nach Perry [82], Auerbach [5]

und Kunzi-Rapp [54] wurden etabliert und miteinander verglichen. Von den drei Kultivierungssystemen hat sich das Perry-System (Abbildung 23) als am besten geeignet erwiesen. Mit ihm ist der Schlupf möglich, der den Nachweis der vollständigen und fehlerfreien Embryogenese zweifelsfrei leistet. Auch mit dem System nach Kunzi-Rapp war der Schlupf möglich, allerdings war die Dokumentation durch die nur maximal 1x2 cm große Öffnung in der Schale nicht zufriedenstellend. Mit dem Auerbachsystem stellte dieser Punkt kein Problem dar. Die Dokumentation war ohne Probleme durch die Petrischale möglich. Bei diesem System war allerdings, sowohl laut Literatur als auch im Experiment, kein Schlupf möglich, der als unverzichtbar erachtet wurde.

Um die Beurteilung der Perry-Kultur zu ermöglichen, wurde experimentell die Überlebensrate von Hühnerembryonen an Tag 18 der Entwicklung bestimmt. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen wie bei Material und Methoden beschrieben. In drei Experimenten (n=35) wurde die durchschnittliche Überlebensquote von $83,6 \pm 4,5$ % ermittelt. Dies kommt dem Wert der als Kontrolle mitgeführten Bruteier (n=45) von $91,2 \pm 6,1$ % sehr nahe. Mit diesem Experiment wurde eine für weitere Experimente ausreichende Stabilität der Kultur nachgewiesen. Der Schlupf gesunder Küken konnte mit der Perry-Kultur wiederholt erfolgreich durchgeführt werden.

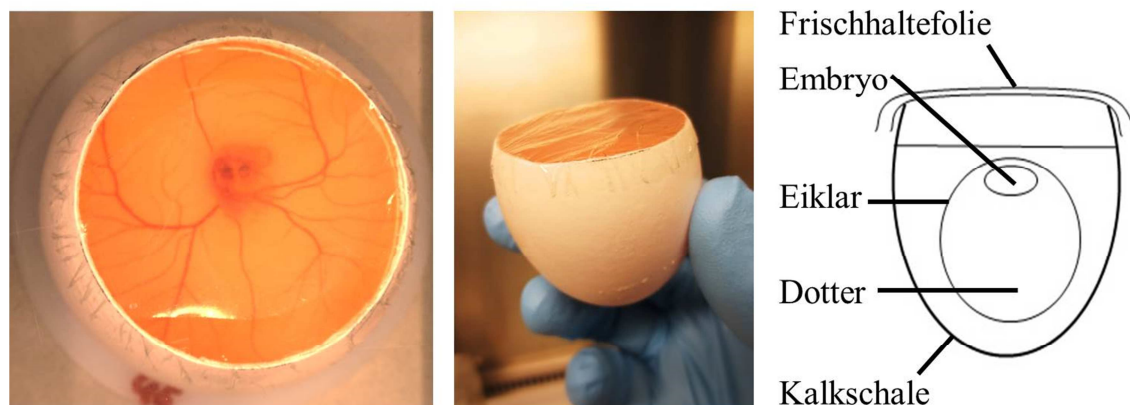


Abbildung 23: Perry-Kultur von Hühnerembryonen. Links: Blick in die Eierschale auf den Hühnerembryo durch die Frischhaltefolie (Entwicklungstag 4). Mitte: Seitansicht der Perry-Kultur. Rechts: Schemazeichnung der Perry-Kultur mit der Lage der einzelnen Komponenten

Obwohl das Perry-System als das beste getestete System identifiziert wurde, zeigte es noch immer Optimierungspotential. Dieses wurde vor allem bei der Dokumentation identifiziert. Zum einen ist eine hochqualitative Dokumentation durch die Frischhaltefolie nicht möglich und zum anderen tritt bei der Dokumentation schnell Kondensation an der Folie auf. Um diese Probleme zu beseitigen, wurde das in Material und Methoden beschriebene Deckelsystem entwickelt, aufgebaut und im Folgenden evaluiert.

Die Optimierung des Perry-Systems mit dem neu entwickelten Deckelsystem sieht eine Befestigung mittels Klebstoff auf der Eierschale vor. Bei einer Klebung handelt es sich um einen chemischen Prozess, bei dem hochreaktive Substanzen in einen mechanisch festen und wenig reaktiven Zustand übergehen. Dieser Prozess findet hier in unmittelbarer Nähe zur embryonalen Entwicklung statt, weswegen eine negative Beeinflussung vorstellbar ist. Zum Ausschluss dieser möglichen Schadquelle wurden verschiedene Klebstoffe auf ihre eventuell toxischen Effekte hin untersucht. Mit sechs verschiedenen Klebstoffen (Loctite 3090[®], Loctite 9480 A&B Hysol[®], EPO-TEK 301[®], NuSil MED-1511[®], B. Braun Histoacryl[®] und Karnaubawachs) wurden auf jeweils zehn Bruteiern Kunststoffringe befestigt. Diese wurden inkubiert und beobachtet. Neben der Schlupfquote und dem Auftreten von Missbildungen wurden auch die Klebekraft, die Härtedauer sowie die Handhabung der einzelnen Klebstoffe bewertet. Als Kontrolle wurden unbehandelte Bruteier zeitgleich bebrütet und beurteilt (Tabelle 2).

Die Bruteier der Kontrolle zeigten eine Schlupfquote von 93,3 % (n=15) und keine feststellbaren Missbildungen. Dies entspricht den Erwartungen und den Ergebnissen bereits durchgeführter Experimente. Bei Loctite 3090[®] zeigte sich eine Schlupfquote von 40 % und eine Missbildungsrate von 20 %. Hierbei handelte es sich jeweils um den gleichen, nicht unerheblichen Defekt, nämlich das Fehlen eines Auges. Die Härtedauer betrug drei Minuten, Klebekraft und Handhabung wurden als ausreichend bewertet. Loctite 9480 A&B Hysol[®] ist ein Zwei-Komponenten Epoxidklebstoff mit hoher Klebekraft. Er zeigte eine Schlupfquote von 60 % sowie eine sehr lange Trocknungsdauer von bis zu 24 Stunden. Auch hier traten Missbildungen (20 % der

Eier) im Bereich der Augen auf. EPO-TEK 301[®] ist ein Epoxidklebstoff speziell für den Gebrauch im medizinischen Bereich. Im Vergleich zu den anderen getesteten Klebstoffen zeigte er eine relativ lange und variable Trockenzeit, die temperaturabhängig zwischen 1 und 24 Stunden lag. Eine Schlupfquote von 40 % wurde festgestellt, Missbildungen sind nicht aufgetreten. Die Handhabung wurde als schlecht bewertet, da die Komponenten manuell gemischt werden mussten. Die Klebekraft wurde mit durchschnittlich bewertet. MED-1511[®] ist ein Klebstoff speziell für den medizinischen Bereich. Neben einer durchschnittlichen Trocknungszeit von zehn Minuten zeigte er eine Schlupfrate von 60 % und keine feststellbaren Missbildungen der Embryonen. Handhabung und Klebekraft wurden für ausreichend befunden.

Tabelle 2: Beurteilung verschiedener Klebstoffe zur Befestigung des Kunststoffringes an der Eierschale von Bruteiern. Beurteilung nach Schlupfrate, Missbildungen, Härtezeit, Klebekraft und Handhabung

Klebstoff	Schlupfquote, %	Härtezeit, Minuten	Klebekraft	Handhabung	Missbildungen n, %
ohne	93,3 (n=15)				0
Loctite 3090 [®]	40,0 (n=10)	3 Min	+	+	20
EPO-TEK 301 [®]	40,0 (n=10)	60-1440Min.	+	-	0
Loctite 9480 A&B HYSOL [®]	60,0 (n=10)	1440Min	++	+	20
NuSil MED-1511 [®]	60,0 (n=10)	10 Min	+	+	0
Karnaubawachs	80,0 (n=10)	<0,5Min.	-	-	0
Histoacryl [®]	100,0 (n=10)	<2 Min	++	++	0

Karnaubawachs ist ein gelbes Pflanzenwachs aus Südamerika, das in der Lebensmittelindustrie (Lebensmittelzusatzstoff E903) z.B. als Überzug von Süßigkeiten verwendet wird. Durch Erwärmen wird es bei etwa 70 °C flüssig und härtet beim

Abkühlen innerhalb von Sekunden aus. Mit dem Wachs wurde eine Schlupfquote von 75 % erreicht. Die Festigkeit der Klebeverbindung muss als mangelhaft und die Handhabung als ungünstig bewertet werden. Es konnten keine Missbildungen festgestellt werden.

Der Histoacryl® Gewebeklebstoff von B. Braun wurde für die Wundversorgung entwickelt. Er wird als alternative Möglichkeit zum Nähen von Wunden in der medizinischen Praxis verwendet. Histoacryl® zeigte eine sehr schnelle Trocknungszeit von unter zwei Minuten und den Schlupf aller Küken. Missbildungen konnten nicht beobachtet werden. Durch sein niederviskoses Fließverhalten ist es möglich, mit geringem Materialaufwand den Ring an der Eierschale zu fixieren. Sowohl die Handhabung als auch die Klebekraft wurden daher mit sehr gut beurteilt. Im Vergleich eignet sich der Gewebeklebstoff am besten für die Befestigung des Deckel-Systems am Ei, weswegen für die weitere Evaluation der Deckelsysteme Histoacryl® verwendet wurde.

Durch das Deckelsystem wurde die Einschränkung der Dokumentationsqualität durch die Frischhaltefolie beseitigt. Daneben bildet die an der Grenzfläche zur kälteren Umgebung auftretende Kondensation ein weiteres Problem für die Dokumentation. Hierfür wurden die in Material und Methoden beschriebenen Antikondensationsmethoden entwickelt und aufgebaut. Der erste Schritt, um die entwickelten Antikondensationsmethoden zu testen, bestand in der Untersuchung der Temperaturstabilität der verwendeten Heizungen. Die Testung erfolgte in einer Langzeitmessung der Glastemperaturen der beiden unterschiedlichen Deckel über den verbauten pt100 Temperatursensor. Die Deckelheizungen wurden auf 37,5 °C eingestellt und die Messwerte aufgezeichnet. Die Messung erfolgte mit verschiedenen Deckeln beider Ausführungen bei Raumtemperatur. Die Warmluftgebläse-Heizung wurde in mehreren Experimenten (n=6) über einen Zeitraum von 72 Stunden untersucht. Eine maximale Abweichung der Glastemperatur von 0,2 °C um den eingestellten Wert (37,5 °C) wurde gemessen. Mit dem gleichen Aufbau wurde die Widerstands-Heizung getestet. In fünf Experimenten konnte ein maximales Abweichen von 0,1 °C vom eingestellten Wert (37,5 °C) gemessen werden.

In-ovo-Kulturen, die mit Wasser gefüllt und mit Deckelsystemen verschlossen wurden dienten zur Testung der Funktionalität der Antikondensationssysteme. Diese Kulturen wurden 30 Minuten im Inkubator (37,5 °C, 65 % RH) bebrütet. Anschließend aus dem Inkubator genommen und die Zeit bis zum Auftreten der Kondensation gemessen. Die Kontrolle stellte eine Kultur mit Deckelsystem ohne Kondensationsschutz dar. Dieser zeigte bereits nach 30 Sekunden erste Wassertropfen als Anzeichen für Kondensation an der Scheibe. Bei den beiden temperaturgeregelten Deckelsystemen konnte die bereits gezeigte Temperaturstabilität erneut festgestellt werden. Die auf 37,5 °C geregelten Deckelsysteme zeigten auch nach 120 Minuten keine Verschlechterung der optischen Eigenschaften durch Kondensation. Zwischen Widerstands-Heizung und Gebläse-Heizung konnte kein Unterschied beobachtet werden. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt.

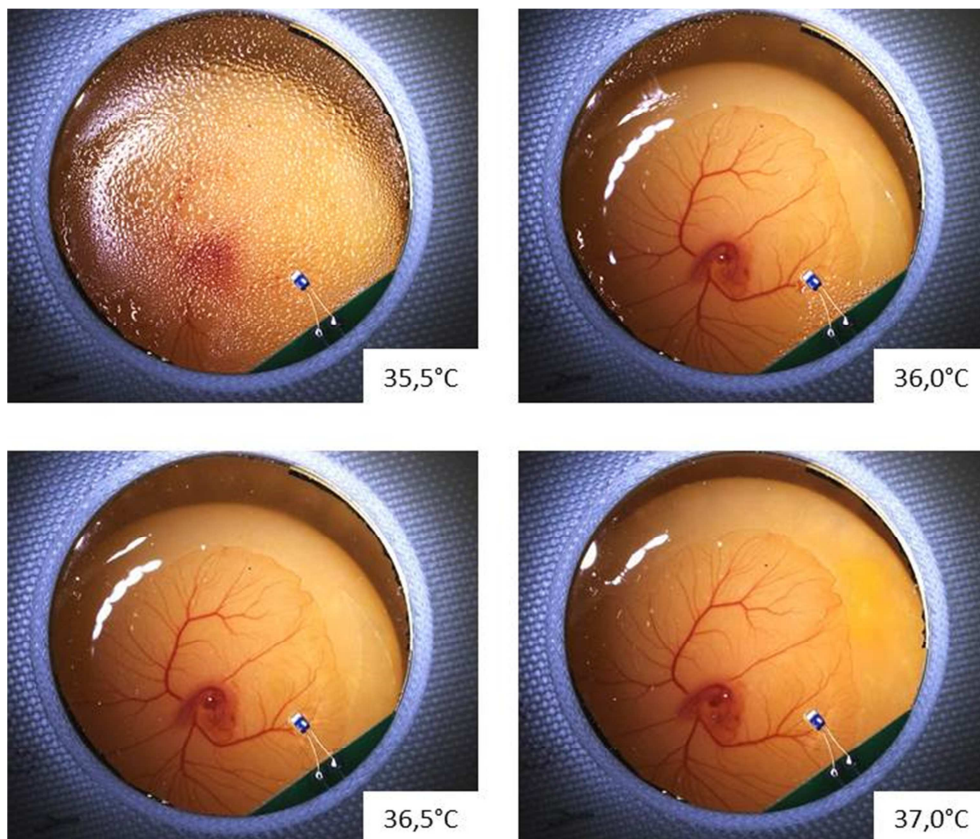


Abbildung 24: Kondensation an der Glasscheibe des Deckelsystems bei unterschiedlichen Glaskulturentemperaturen (35,5, 36,0, 36,5 und 37,0 °C). Regelung der Glaskulturentemperatur über die Widerstands-Heizung. Umgebungstemperatur betrug 21,0 °C. Kondensationsfreiheit konnte ab 36,5 °C aufwärts erreicht werden

Um den Embryo vor Hitzeschäden zu schützen, wurde die für die permanente Kondensationsfreiheit minimal benötigte Glastemperatur bestimmt (Abbildung 24). Das Experiment wurde durchgeführt, indem die Glasscheibe der Raumtemperatur ausgesetzt wurde, der untere Teil der Kultur hingegen auf 37,5 °C temperiert wurde, um den Embryo am Leben zu erhalten. Die Glastemperatur wurde in mehreren Versuchsreihen (n=3) auf 35,5, 36,0, 36,5 und 37,0 °C geregelt. Im Abstand von zehn Minuten wurden die Deckel der Kulturen auf Kondensation geprüft. Dieses Experiment wurde mit beiden Heizungen durchgeführt. Eine permanente Verhinderung der Kondensation konnte bei beiden Heizungen ab einer Glastemperatur von 36,5 °C erreicht werden.

Der Nachweis der Funktionalität des Deckelsystems kann nur durch die vollständige Entwicklung eines gesunden Kükens gezeigt werden, da nur so eine Schädigung durch die Optimierung des Perry-Systems zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann. Mit dem Dokumentations- (n=3) sowie dem Manipulationsdeckel (n=3) wurden In-ovo-Kulturen inkubiert und zum Schlupf gebracht. Die Deckelheizungen wurden hierbei zunächst nicht verwendet, um das Anti-Kondensationssystem als Schadquelle ausschließen zu können. An Tag 19 und 20 der Inkubation wurde analog der Perry-Kultur jeweils ein 1 mm großes Loch am oberen Ende der Schale gebohrt. Die Schrauben des Deckels wurden an Tag 20 entfernt, um dem Tier das Schlüpfen zu ermöglichen. Als Kontrolle wurden Bruteier (n=15) zeitgleich inkubiert. Diese zeigten eine Schlupfquote von 93,3 %. Für die Kulturen mit Dokumentationsdeckel konnten drei gesunde Tiere zum Schlupf gebracht werden, ebenso beim Manipulationsdeckel. Missbildungen wurden zu keiner Zeit festgestellt. Die aus den mit Deckelsystemen bestückten In-ovo-Kulturen geschlüpften Küken waren nicht von den Küken der Kontrolle unterscheidbar. Hierbei wurden Gewicht, Größe und Aktivität betrachtet.

Die Evaluation des vollständigen Deckelsystems inklusive der beiden Heizungen erfolgte in einem weiteren Schlupfexperiment. Die In-ovo-Kulturen wurden dergestalt präpariert, dass jeder Deckel in Kombination mit jeder Heizung untersucht wurde. Die Ventilationsöffnungen an Tag 19 und 20 sowie die Entfernung der Schrauben an Tag 20 wurde durchgeführt, um den Schlupf zu ermöglichen. Die Widerstands- und die Gebläse-Heizung des Deckels wurden im Schlupfexperiment mit der für Kondensationsfreiheit minimal notwendigen Temperatur von 36,5 °C betrieben. Es konnten mit allen getesteten Kombinationen wiederholt (n=3) gesunde Küken zum

Schlupf gebracht werden. Die als Kontrolle mitgeführten Bruteier (n=15), die der gleichen Charge entstammten wie die im Experiment verwendeten Bruteier, zeigten eine Schlupfquote von 86,6 % und keinerlei Missbildungen. Kondensation wurde für die gesamte Dauer des Experimentes erfolgreich verhindert. Kontroll- sowie Versuchstiere waren nicht unterscheidbar in ihrer Größe, ihrer Aktivität und ihrem Gewicht. Mit dem wiederholt erfolgreichen Schlupf kann das Deckelsystem inklusive der beiden Antikondensationsmethoden, in allen Kombinationen von Deckel und Heizung, als evaluiert angesehen werden. Damit steht für weitere experimentelle Arbeiten eine Kulturform zur Verfügung, die sich durch Stabilität, Handhabbarkeit hohe Qualität der Dokumentationsmöglichkeit und der Möglichkeit zur Manipulation auszeichnet.

3.1.2 Evaluation des Inkubators für eine In-ovo-Kultur

Der Aufbau eines neuen Inkubators erschien notwendig, da die kommerziell verfügbaren Inkubatoren nicht auf die Anforderungen einer wissenschaftlichen Nutzung, sondern auf die Bebrütung einer möglichst hohen Anzahl von Eiern ausgelegt sind. Für die wissenschaftliche Nutzung mit Schwerpunkt auf Dokumentation und Manipulation ist keiner der bekannten kommerziell erhältlichen Inkubatoren geeignet. Die Neuentwicklung sollte die angesprochenen Eigenschaften aufweisen, um das wissenschaftliche Arbeiten mit In-ovo-Kulturen, vor allem der mit dem Deckel-System optimierten Perry-Kultur, zu erleichtern. So sollten etwa eine automatisierte Inkubation und Dokumentation, elektrische Autarkie der wichtigsten Funktionen und eine kompakte Bauweise zentraler Bestandteil der Neuentwicklung sein. Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurde der unter Material und Methoden beschriebene Inkubator für eine In-ovo-Kultur entwickelt und aufgebaut.

Zur Evaluierung des Inkubators wurde zunächst die Laufzeit im Akkumulator Betrieb gemessen. In drei Versuchen konnte eine durchschnittliche Laufzeit von $8,5 \pm 0,7$ Stunden festgestellt werden. Für einen Zeitraum von 21 Tagen wurde eine Langzeitmessung der Temperatur und der RH im Inkubator durchgeführt, um die Stabilität der Inkubationsparameter nachzuweisen (Abbildung 25). Die Parameter wurden auf $37,5 \text{ °C}$ und 65 \% RH gesetzt. Zur Messung wurde ein geeichter

Ergebnisse

Datenlogger (MSR) genutzt. Dieser wurde an der Position der In-ovo-Kultur an deren Position platziert. Um einen Wärme- und Feuchtigkeitsverlust nach oben zu vermeiden, wurde die Öffnung durch einen Deckel verschlossen. Die Ventilationsöffnungen wurden während des Versuchs in der gleichen, jeweils halb geöffneten Position gehalten. Die für die Brut optimale Temperatur von 37,5 °C sowie die Luftfeuchtigkeit von 65 % wurden innerhalb von 60 Minuten nach Einschalten des Gerätes erreicht. Die längerfristige Beobachtung der Werte zeigte eine maximale Schwankung der Temperatur von $\pm 0,7$ °C um den eingestellten Wert. Die Luftfeuchtigkeit schwankte maximal um $\pm 1,5$ %. Über den Zeitraum von 21 Tagen konnte das Klima bei regelmäßigem Nachfüllen des Wasserreservoirs (nach jeweils 72 Stunden) konstant gehalten werden. Dieses Ergebnis wurde bei der Wiederholung des Experimentes bestätigt.

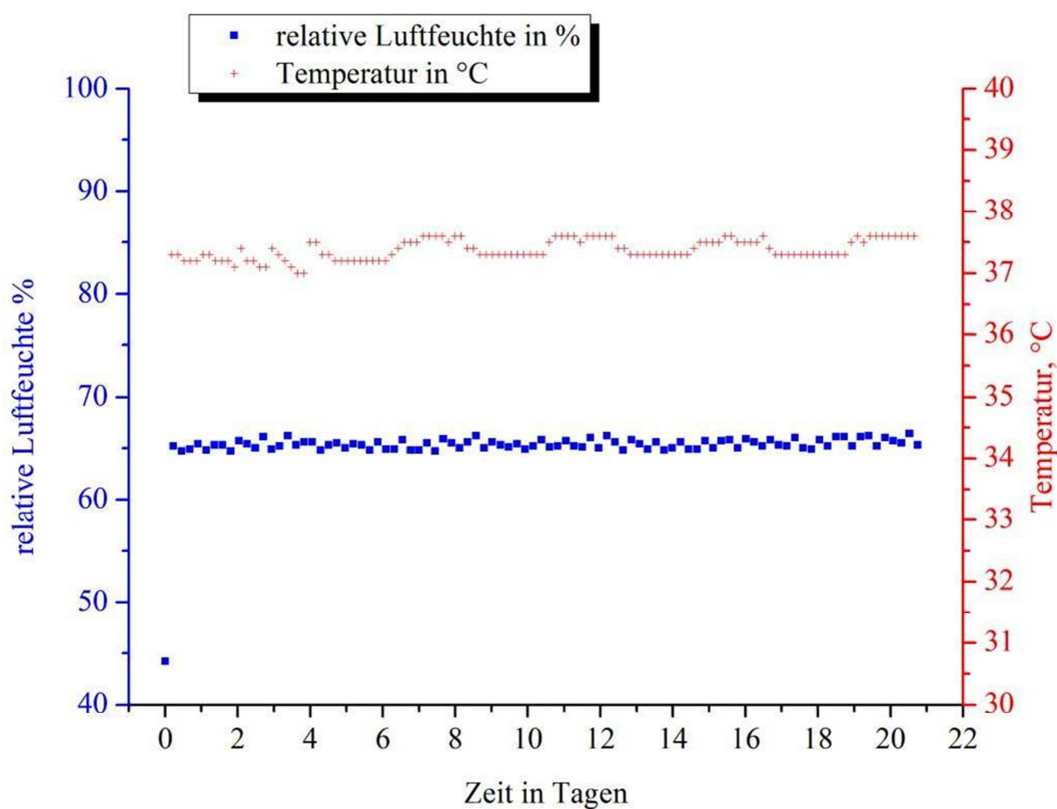


Abbildung 25: Langzeitmessung von Klimaparametern im Inkubationsraum. Verlauf von relativer Luftfeuchtigkeit (blau) und Temperatur (rot) gemessen über 21 Tage. Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Inkubationsraum des Inkubators gemessen über 18 Tage bei geschlossenem Inkubationsraum

Die maximale Betriebszeit ohne Nachfüllen des Wasserreservoirs wurde im wiederholten Experiment (n=3) mit $6,6 \pm 0,3$ Tagen ermittelt. Die Zeitnahme erfolgte mit Abfallen der RH unter 60 %. Zum Nachweis der ausreichenden Ventilation des Inkubationsraumes wurde eine Langzeitmessung der Sauerstoffkonzentration durchgeführt (18 Tage). Hierzu wurde mit einem Sauerstoffmessgerät zweimal täglich die Sauerstoffkonzentration im Inkubationsraum gemessen (Abbildung 26). Um den Sauerstoffverbrauch durch den Embryo zu berücksichtigen, wurde der Versuch mit einem sich in der Entwicklung befindenden Embryo in Perry-Kultur wiederholt. Während des Experimentes waren die drei Ventilationsöffnungen vollständig geschlossen, um die minimale Ventilation zu simulieren. Der Embryo war während der gesamten Dauer des Experimentes am Leben und zeigte eine normale Entwicklung. Die Sauerstoffkonzentration im Inkubationsraum betrug $21,0 \pm 0,4$ %. Selbst der vollständige Verschluss der Ventilationsöffnungen zeigte keine Veränderung der O_2 -Konzentration während den 18 Tagen der Messung.

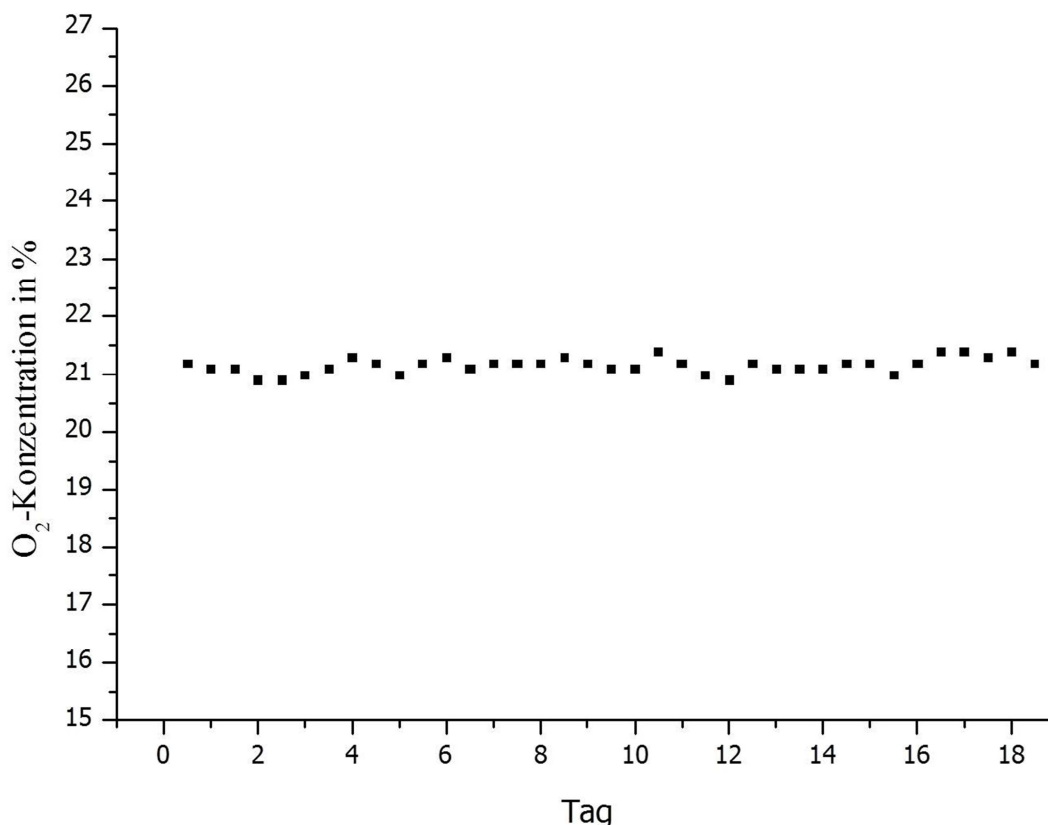


Abbildung 26: Langzeitmessung von Klimaparametern im Inkubationsraum. Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Inkubationsraum des Inkubators gemessen über 18 Tage bei geschlossenem Inkubationsraum

Die Funktion des Manipulationsdeckels im Inkubator wurde getestet, indem über eine 1 ml Spritze mit Kanüle an verschiedenen Punkten geringe Flüssigkeitsmengen von etwa 100 µl in den Dotter eines kultivierten Hühnerembryos injiziert wurden. Bei der injizierten Flüssigkeit handelte es sich um Wasser, welches mit Patentblau V gefärbt wurde und die Verfolgung der Manipulation deutlich erleichterte. Die Injektionen erfolgten ohne direkten Blickkontakt über die Dokumentationseinheit des Inkubators. Die drei Injektionen konnten präzise an den beabsichtigten Stellen vorgenommen werden. Während der Injektion, über den Manipulationsdeckel, war die gesamte Oberfläche der In-ovo-Kultur erreichbar.

Die automatisierte Dokumentation der Kulturen ist ein komplexer Vorgang, der in sich schlüssig und auf mehrere Parameter abgestimmt werden muss. Zunächst wurde die Wendung der In-ovo-Kulturen betrachtet. Die Nutzung des Standardinkubationsprotokolls im Standardinkubator (von Position zu Position in 120 Minuten) würde im neu entwickelten Inkubator zu einer hohen Anzahl unbrauchbarer Aufnahmen führen. Um diesen Prozess zu optimieren, wurde zunächst in einer Testreihe die Überlebensquote von Hühnerembryonen in Perry-Kulturen ohne Wendung untersucht, da die Möglichkeit der Inkubation ohne Wendung die einfachste Lösung darstellt unbrauchbare Bilder zu vermeiden. In zwei Testgruppen wurden Hühnerembryonen in unterschiedlichen Standardinkubatoren bebrütet (Abbildung 27). Die Kontrollgruppe wurde nach Standardprotokoll jede 120 Minuten gewendet, die Testgruppe wurde nicht gewendet. Die Überlebensrate an Tag 18 wurde als Beurteilungskriterium verwendet. Im Experiment überlebten 42,3 % der nicht gewendeten Kulturen, bei der Kontrollgruppe 84,6 %. Ein ähnliches Ergebnis wurde im Wiederholungsexperiment gefunden. Hier überlebten in der Testgruppe 30,0 %, in der Kontrollgruppe 70,0 % der Embryonen, bis Tag 18. Die Inkubation ohne Wendung wurde daher nicht weiter in Betracht gezogen.

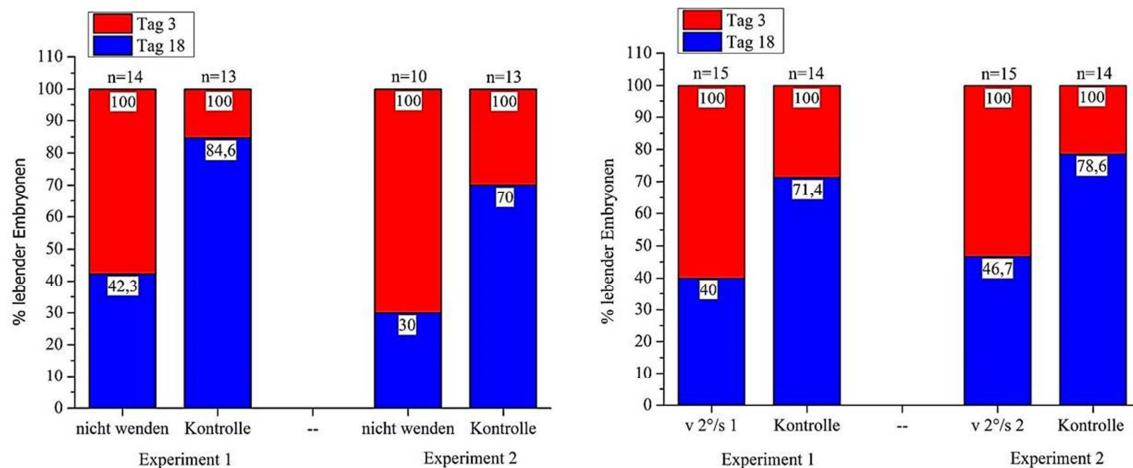


Abbildung 27: Auswirkung von Wendung und Wendegeschwindigkeit auf die Überlebensrate von Hühnerembryonen in Perry-Kultur. Links: Keine Wendung gegen Kontrolle (eine Wendung pro 120 Minuten) Rechts: Erhöhte Wendegeschwindigkeit (2 °/s) gegen Kontrolle (0,6 °/s) aufgetragen

In der Erhöhung der Wendegeschwindigkeit wurde eine weitere Möglichkeit zur Optimierung des Wendeprotokolls gesehen. Die Auswirkung einer erhöhten Wendegeschwindigkeit wurde daraufhin im Experiment untersucht (Abbildung 27). Aus einer Anzahl Perry-Kulturen wurden zwei Gruppen gebildet. Die Kontrollgruppe wurde nach Standardprotokoll inkubiert. Die Wendegeschwindigkeit des Standardinkubators, mit dem die Kontrollgruppe inkubiert wurde, betrug 0,6 °/s. Für die Testgruppe wurde ein zweiter Inkubator so umgebaut, dass die Wendegeschwindigkeit stufenlos regelbar war. Als Testgeschwindigkeit wurde 2 °/s gewählt. Ähnlich wie beim vollständigen Weglassen des Wendens zeigt das schnelle Wenden mit 2 °/s einen negativen Einfluss auf die Überlebensrate der Embryonen. Im Experiment überlebten in der Testgruppe bei schnellem Wenden nur 40,0 % der Embryonen, wohingegen in der Kontrolle 71,4 % überlebten. Ein ähnliches Ergebnis konnte im Wiederholungsexperiment ermittelt werden. Die Überlebensquote der Testgruppe lag hier bei 46,7 %, die der Kontrollgruppe bei 78,6 %. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, die Wendung im Inkubationsprotokoll mit einer Geschwindigkeit von 0,6 °/s anzusetzen, um eine Schädigung der Embryonen zu vermeiden.

Die Anpassung des Wendeprotokolls über die Wendegeschwindigkeit und das Weglassen der Wendung war damit als nicht zielführend abzulehnen. Daher musste das Wendeprotokoll in seinem zeitlichen Ablauf angepasst werden. Dazu wurde zunächst

eine Einschätzung über ein geeignetes Dokumentationsintervall angestellt. Ein Bild pro 20 Minuten erschien angebracht. Das Wendeprotokoll wurde nun derart abgewandelt, dass die Kultur zunächst 120 Minuten in der Waagerechten verbleibt, nach vorne wendet und nach weiteren 20 Minuten in die Waagerechte zurückgewendet wird. Somit entsteht nur ein unbrauchbares Bild pro 120 Minuten. Dieses Protokoll wurde mit fünf In-ovo-Kulturen erprobt. Von diesen fünf Kulturen überlebten alle bis Tag 18, dies bestätigte die Eignung des Wendeprotokolls.

Bei der automatisierten Dokumentation tritt ein weiterer Effekt auf, der im natürlichen Ablauf der embryonalen Entwicklung, aber auch bei der Inkubation im Standardinkubator, dergestalt nicht vorkommt. Um die Dokumentation in ausreichender Qualität durchführen zu können, ist es zwingend notwendig, den Embryo zu beleuchten. Im Brutei wird der Embryo durch die Schale vom Außenlicht abgeschirmt, was, abgesehen vom Tag-Nacht-Rhythmus, eine gleichbleibende Lichtstärke gewährt. In der In-ovo-Kultur kann das Licht durch die Öffnung des Dokumentationsfenster des Deckelsystems zu dem Embryo vordringen. Bei den experimentellen Arbeiten wurde festgestellt, dass die Embryonen schon sehr früh (Tag 4) auf Licht reagieren. Für die Dokumentation ergeben sich verschiedene Möglichkeiten der Beleuchtung. Während eine Dauerbeleuchtung einfacher zu realisieren ist, bietet die Beleuchtung in Intervallen den Vorteil der geringeren Reizung des Embryos.

Die Untersuchung der Auswirkung von Licht auf den sich entwickelnden Embryo erschien zur Optimierung des Beleuchtungsprotokolls notwendig, da diese frühzeitig auf Lichteinwirkung reagieren (Abbildung 28). Im Experiment wurden zwei Gruppen von Perry-Kulturen gebildet. Die Testgruppe wurde bei permanenter Beleuchtung mit einem Weißlicht LED-Ring (Beleuchtungsstärke 1100 Lux) kultiviert, während die Kontrollgruppe im Dunkeln inkubiert wurde. An Tag 18 wurde die Überlebensquote bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Überlebensquote bei Dauerbeleuchtung. In beiden Experimenten wurde eine Überlebensquote von jeweils 50 % festgestellt. Die Kontrolle zeigte hingegen eine Überlebensquote von 87,5 bzw. 77,7 %.

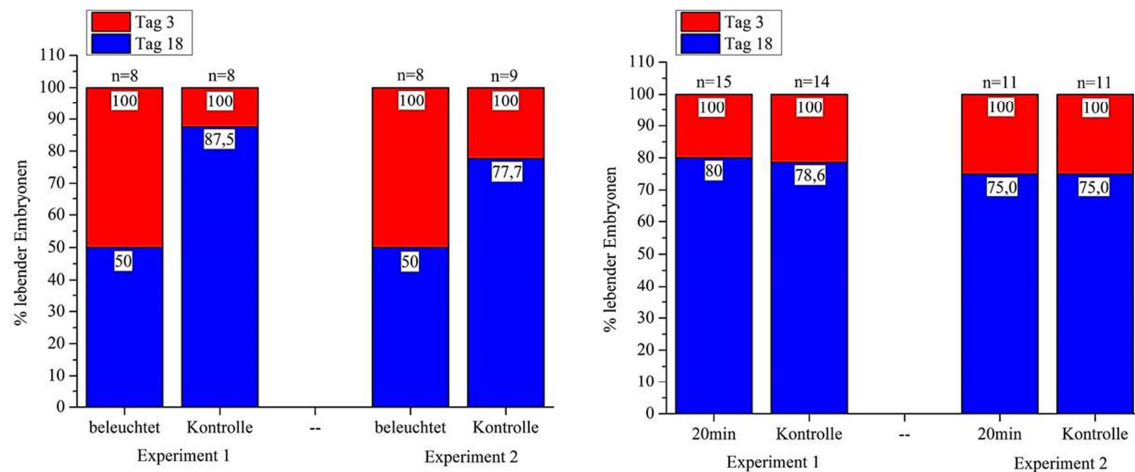


Abbildung 28: Auswirkung von Dauerbeleuchtung und 20 Minuten Beleuchtungsintervall auf die Überlebensrate von Hühnerembryonen in Perry-Kulturen. Links: Aufgetragen wurde Dauerbeleuchtung(1100Lux Weißlicht-LED) gegen die Kontrolle (Keine Beleuchtung). Rechts: Aufgetragen wurde Intervallbeleuchtung im 20 Minuten Takt für 3 Sekunden (1100 Lux Weißlicht-LED) gegen die Kontrolle (Keine Beleuchtung)

Als ein für die automatisierte Dokumentation geeignetes Beleuchtungsintervall wurden 20 Minuten festgelegt. Als Maßstab wurde hier ein Experiment genommen, bei dem für das Tissue Engineering geeignetes Gewebe im Ei kultiviert wird und bei dem der Fokus auf der Dokumentation der Veränderungen dieses Gewebes liegt. Um die Auswirkung der Beleuchtung in diesem Intervall auf die Überlebensquote zu ermitteln, wurde ein entsprechendes Experiment durchgeführt. Es wurden im Dunkeln inkubierte Perry-Kulturen mit solchen verglichen, welche in 20 Minuten-Intervallen für drei Sekunden beleuchtet wurden. Die Beleuchtung erfolgte mit einem LED-Ringlicht (1100 Lux). Das Experiment wurde zweimal wiederholt. Die Überlebensrate der Kontrolle sowie der beleuchteten Kulturen lag in beiden Experimenten auf gleichem Niveau. Die Quote der beleuchteten Kulturen lag mit 80 % knapp über der der Kontrollgruppe mit 78,6 %. Bei der Wiederholung des Experimentes lagen die Quoten beider Gruppen bei 75,0 %. Da die Beleuchtung im 20-Minuten-Intervall keine negative Veränderung der Überlebensquote bewirkte, erscheint dieses Intervall für die Dokumentation geeignet. Für die automatische Dokumentation wurde die Beleuchtung daher so umgesetzt, dass die Kamera mit der Beleuchtung gekoppelt wurde und so nur eine minimale Lichtexposition auftritt. Lediglich für die Dauer der Aufnahme findet eine Beleuchtung des Eies von drei Sekunden statt. Dieses System wurde für Aufnahmeintervalle von 5

und 30 Sekunden sowie 1, 5, 15, 45, 60 und 120 Minuten getestet. In allen getesteten Zeitintervallen wurde eine optimale Ausleuchtung des Testobjektes erzielt.

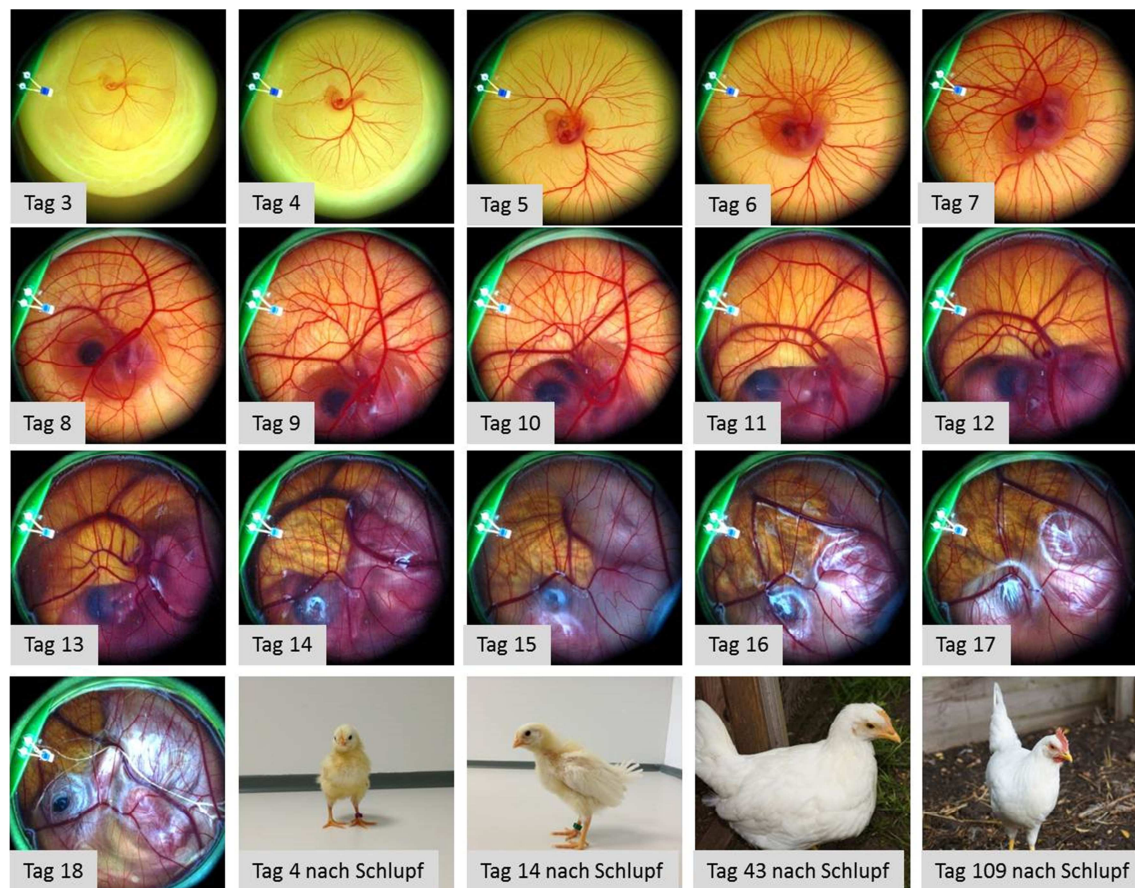


Abbildung 29: Automatische Dokumentation der Embryogenese des Huhnes von Tag 3 bis Tag 18 im entwickelten Inkubationssystem für eine In-ovo-Kultur. Gezeigt sind ausgewählte Bilder von jedem Tag. Im Anschluss ist die Entwicklung des im Inkubator ausgebrüteten Tieres bis zum Erwachsenenstadium gezeigt

Der Nachweis der Funktionalität des Inkubators kann ähnlich wie beim Deckelsystem nur durch den erfolgreichen Schlupf eines gesunden Kükens, hierbei mit vollständiger automatischer Dokumentation der Embryogenese (Abbildung 29), erbracht werden. Daher wurde eine In-ovo-Kultur in den auf 37,5 °C und 65 % RH geregelten Inkubator eingesetzt. Die Kultur wurde mit einem Dokumentationsdeckel verschlossen und über die Widerstandsheizung frei von Kondensation gehalten. Die Deckeltemperatur wurde auf 36,5 °C konstant geregelt, um die durchgängige Dokumentation im 20-Minuten-Rhythmus zu gewährleisten. Die Wendung erfolgte alle zwei Stunden mit einer

Geschwindigkeit von 0,6 °/s. An Tag 18 wurde die Kultur in einen Schlupfinkubator überführt, um den Schlupf zu ermöglichen. An Tag 19 wurden zwei Löcher in die Schale gebohrt, um die Umstellung der Atmung zu ermöglichen. An Tag 20 wurden die Schrauben des Deckels entfernt.

Ein gesundes weibliches Küken konnte aus eigener Kraft an Tag 21 schlüpfen. Das Versuchstier wurde mit drei Kontrolltieren, die alle am gleichen Tag schlüpften, gehalten und bis ins Erwachsenenstadium beobachtet. Bei der Gruppe handelte es sich um zwei weitere Weibchen und ein Männchen. Die Beobachtung des Sozialverhaltens in der Kleingruppe zeigte keinerlei Merkmale sozialer Abnormität bei dem Versuchstier. Die Gewichtszunahme über die Zeit entsprach den Werten der Vergleichstiere. Nach zehn Wochen erfolgte bei den weiblichen Tieren die erste Eiablage. Um einen reproduktionsschädlichen Effekt durch die Kultivierung in dem aus Deckelsystem und Inkubator bestehenden Aufbau auszuschließen, wurde das Versuchstier für einige Tage von dem Rest getrennt und die von ihm gelegten Eier untersucht. Die gesammelten Eier (n=10) wurden für drei Tage inkubiert, geöffnet und auf Befruchtung untersucht. Von den untersuchten Eiern zeigten 90 % einen normal entwickelten Embryo (Abbildung 30, links), 10 % waren unbefruchtet. Von den befruchteten Eiern wurde eines zusammen mit zwei Kontrolleiern ausgebrütet. Das geschlüpfte Jungtier (Abbildung 30, rechts) zeigte eine normale Entwicklung sowie ein normales Sozialverhalten gegenüber den Kontrolltieren.

Das Schlupfexperiment wurde sowohl mit dem Manipulationsdeckel als auch mit der Gebläse-Heizung wiederholt (je zweimal). Alle Experimente konnten mit dem erfolgreichen Schlupf eines gesunden und normal entwickelten Jungtieres sowie der vollständigen Dokumentation der Entwicklung abgeschlossen werden. Pro Experiment wurden so etwa 1100 Bilder (1 Bild/ 20 Minuten für fast 16 Tage) in hoher Qualität generiert, die für eine nachträgliche Bearbeitung sehr gut geeignet sind. Ein Zeitrafferfilm wurde aus einer der Bilderreihen zu Anschauungszwecken generiert.

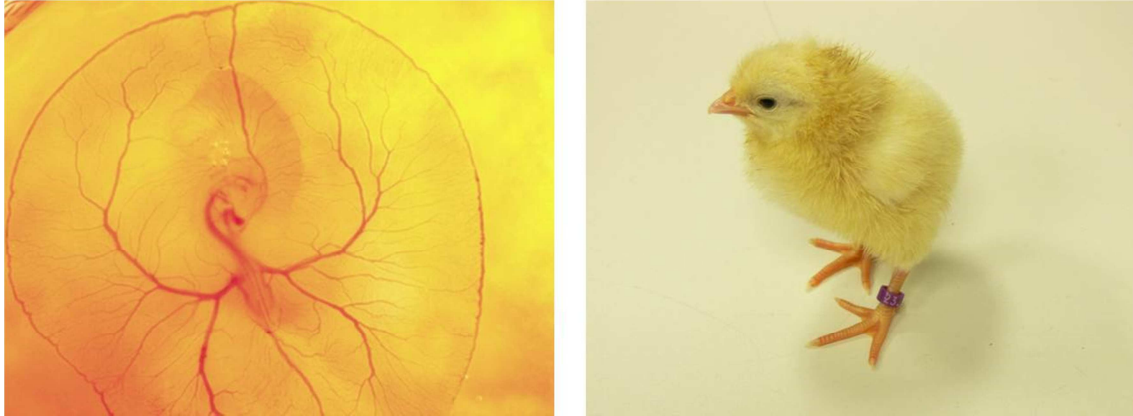


Abbildung 30: Nachkommen des im Inkubator ausgebrüteten Tieres. Links: Befruchtetes Ei (gelegt 11 Wochen nach Schlupf des Versuchstieres) nach 3 Tagen Bebrütung geöffnet. 90 % der untersuchten Eier zeigten normal entwickelte Embryonen. Rechts: Normal entwickeltes Eintagesküken geschlüpft aus den Bruteiern des Versuchstieres

3.1.3 Evaluation des Inkubators für mehrere In-ovo-Kulturen

Der Inkubator für eine In-ovo-Kultur wurde dem Bedarf nach einem System mit hoher Flexibilität und Mobilität sowie der Möglichkeit zur hochqualitativen Dokumentation und Manipulation folgend entwickelt. Für Experimente mit einer größeren Anzahl Kulturen muss eine Parallelisierung, also eine gleichzeitige Durchführung von Experimenten mit mehreren Inkubatoren, erfolgen. Dies ist nicht kosteneffizient oder zeitsparend, weswegen ein zweiter Inkubator entwickelt und aufgebaut wurde, der eine größere Anzahl von In-ovo-Kulturen parallel inkubieren kann und, mit Ausnahme der kompakten Bauweise, alle Eigenschaften des Inkubators für eine In-ovo-Kultur besitzt. Der Inkubator für bis zu 24 In-ovo-Kulturen wurde entwickelt und, wie in Material und Methoden beschrieben, aufgebaut. Die Evaluation des Inkubators begann mit der Überprüfung der technischen Parameter.

In einem Langzeittest über 18 Tage wurden mit einem geeichten Datenlogger (MSR) RH und Temperatur in der inneren Inkubationskammer gemessen. Die Auswertung zeigte eine konstante Temperatur um den eingestellten Sollwert von 37,5 °C. Die Schwankungen um diesen Wert betrugen maximal $\pm 0,5$ °C. Eine stabile Temperatur wurde 21 Stunden nach Einschalten des Inkubators erreicht. Nach 17 Stunden konnte eine RH von 65 ± 4 % erreicht und gehalten werden. Besonders in der frühen Testphase schwankten die Feuchtigkeitswerte noch und stabilisierten sich nach 17 Stunden

zunehmend. Über 15 Tage wurde die Sauerstoffkonzentration im mit Perry-Kulturen bestückten Inkubationsraum verfolgt. Sie lag zu keinem Zeitpunkt unter einem Wert von 20,7 %, was eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff über den gesamten Zeitraum gewährleistet.

Die automatisierte Dokumentation der In-ovo-Kulturen gestaltete sich bei diesem Inkubationssystem komplexer als bei dem weiter oben beschriebenen Inkubator. Hier galt es, pro Dokumentationsereignis alle Kulturen anzusteuern und zu dokumentieren. Durch die höhere Anzahl der Kulturen musste eine zeitliche Begrenzung des Dokumentationsintervalls gefunden werden. Für verschiedene Anzahlen von Kulturen wurden die minimalen Intervalle bestimmt. Für eine Kultur betrug die Zeit 15 Sekunden, für 3 Kulturen 1 Minute, für 10 Kulturen 4,5 Minuten und für 24 Kulturen 11 Minuten.

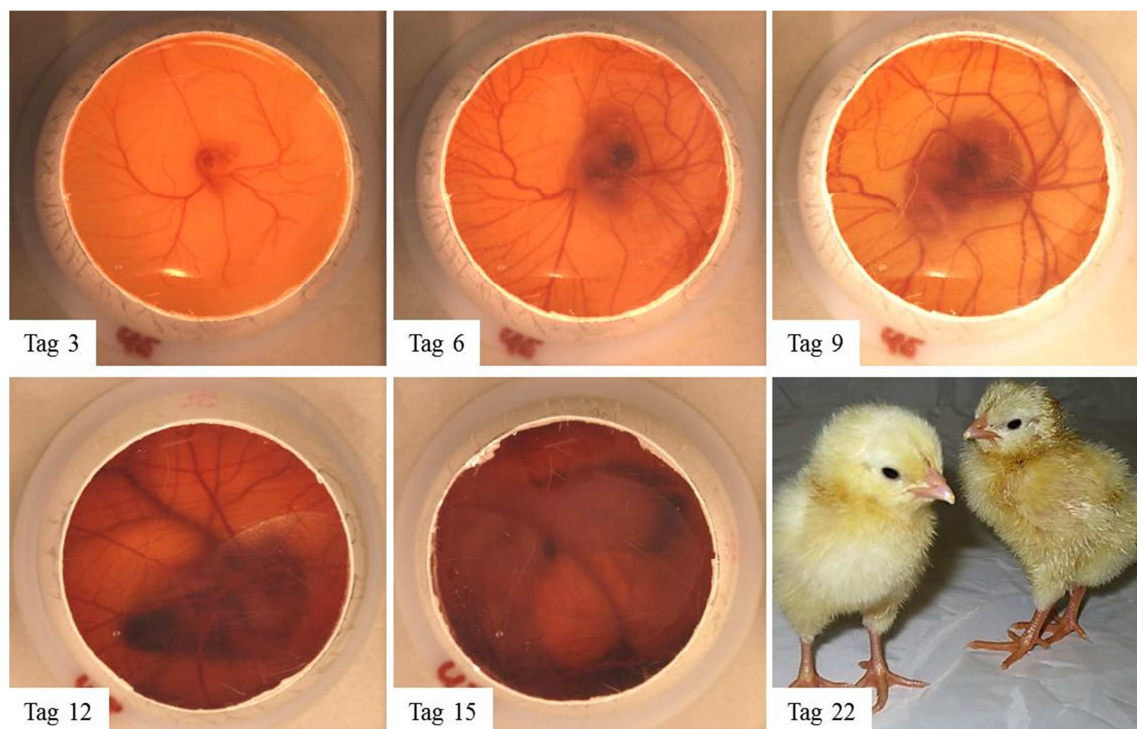


Abbildung 31: Automatisierte Dokumentation von Embryonen in Perry-Kulturen im Inkubator für mehrere In-ovo-Kulturen. Gezeigt sind ausgewählte Bilder zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung sowie der geschlüpften Jungtiere

Da bei diesem neuen Inkubator die Dokumentation mittels Kamera als auch mit Hilfe eines Fluoreszenzbinokulars möglich ist, wurden beide Varianten mit In-ovo-Kulturen durchgeführt. Die Dokumentation mit Kamera konnte mit drei Kulturen über fünf Tage und einem Dokumentationsintervall von fünf Minuten erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 31). Ebenso erfolgreich verlief die die Dokumentation von drei fluoreszierenden Proben mit dem Binokular über 24 Stunden mit einem Dokumentationsintervall von fünf Minuten. Hierbei wurde den Erkenntnissen aus den Experimenten zum Wenden und zur Beleuchtung von Hühnerembryonen Rechnung getragen. Die Wende- und die Verfahrgeschwindigkeit wurden auf 0,6 °/s bzw. 1 cm/s begrenzt und die Beleuchtung auf den Zeitraum der Dokumentation von ca. drei Sekunden pro Kultur festgelegt.

Das abschließende Experiment der Evaluation des Inkubators bildete, wie zuvor beim Inkubator für eine In-ovo-Kultur, ein Schlupfexperiment mit automatisierter Dokumentation. Hierfür wurden fünf Perry-Kulturen präpariert und in der inneren Inkubationskammer verteilt. Das Dokumentationsintervall wurde mit 20 Minuten für die vollständige Dokumentation aller fünf Kulturen gewählt. 80 % der Kulturen konnten zum Schlupf gebracht werden. Die geschlüpften Küken waren alle gesund und normal entwickelt. In einem Wiederholungsexperiment mit fünf weiteren Perry-Kulturen konnten vier zum Schlupf gebracht werden. Die Küken zeigten alle ein normales Verhalten und eine den Kontrolltieren vergleichbare Entwicklung.

3.1.4 Vollständig künstliche Schalensysteme

Obwohl sich das optimierte Perry-System für die Untersuchung der Nutzbarkeit des Hühnereies zur Kultivierung von Zellen und Geweben gut eignet, kann diese Kulturform nur eine Brückenlösung darstellen. Sollte sich dieser Ansatz als zielführend erweisen, muss eine besser definierte, eine vollständig artifizielle, Kultivierungsform entwickelt werden, um eine optimale Kontrolle der Kultivierung zur gewährleisten. Die Eignung dieser vollständig künstlichen Kultivierungsform muss, wie auch bei dem optimierten Perry-System geschehen, durch den Schlupf eines gesunden Jungtieres nachwiesen werden. Für die experimentellen Arbeiten an dieser Kultivierungsform, ist der Schlupf das Ziel. Auf dem Weg zum Schlupf müssen weitere Parameter zur

Beurteilung der Kultivierungsform herangezogen werden. Als geeignet hierfür erscheinen die maximale Entwicklung und die durchschnittliche Entwicklung.

Zunächst gilt es die wichtigste Funktion der Kalkschale, die Versorgung mit Kalzium, für ein künstliches Kulturbedeinhalt sicher zu stellen. Dies kann über die Einarbeitung einer Kalziumquelle in die Wand des Kulturbedeinhalters oder über die Zugabe einer Kalziumquelle in die unmittelbare Umgebung des Embryos erfolgen. Erstere Variante würde in einer starken Einschränkung der Materialauswahl resultieren weswegen Variante zwei als zielführender empfunden wurde. Kamihira setzt in seinem artifiziiellen Kulturbedeinhalt für Wachteln Kalzium-Laktat ein, um die Kalziumversorgung sicher zu stellen [51]. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden 400 µl Kalzium-Laktat in flüssigem Eiklar (0,07 g/ml) und 100 mg autoklaviertem Eierschalpulver (Huhn) als Zusatz pro Embryo gewählt. Die Menge an Kalzium-Laktat trägt hierbei dem höheren Gewicht des Hühnereis gegenüber des Wachteleis Rechnung.

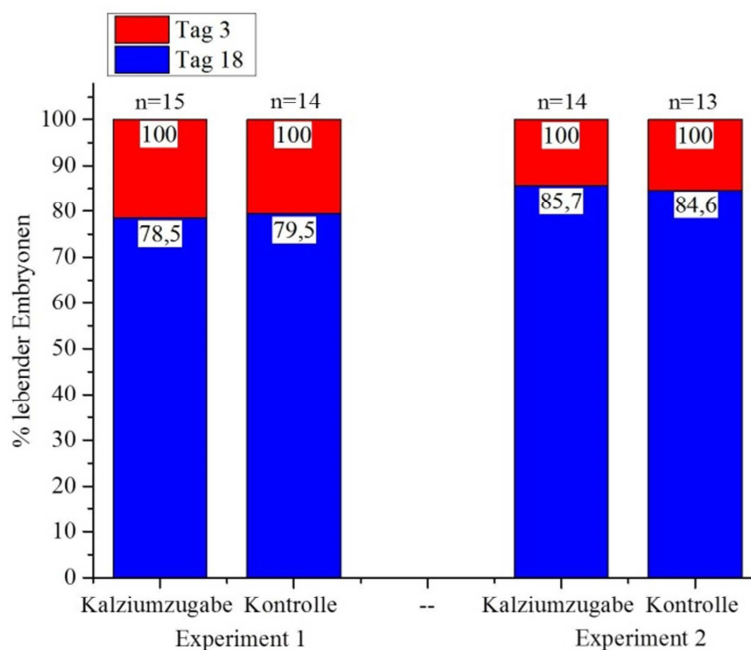


Abbildung 32: Auswirkung der Zugabe von Kalzium auf die Überlebensquote von Hühnerembryonen in Perry-Kulturen. Überlebensquote an Tag 18 inkubiert mit Kalzium-Laktat (0,07 g/ml Eiklar) und Eierschalpulver (100 mg) verglichen mit der Kontrolle

Um einen möglichen negativen Einfluss der Kalziumzusätze auszuschließen, wurden die beiden Zusätze frisch präparierten Perry-Kulturen zugegeben und deren Überlebensquote an Tag 18 der Entwicklung mit unbehandelten Kontrollkulturen verglichen (Abbildung 32). Die Überlebensquote beider Gruppen zeigt ähnliche Resultate (78,5 % mit Kalziumzusatz, 79,5 % Kontrollgruppe). Im Wiederholungsexperiment konnte das Ergebnis reproduziert werden (85,7 % bei Kalziumgabe, 84,6 % bei der Kontrolle). In weiteren Experimenten wurden Kalzium-Laktat und Schalenpulver einzeln getestet. Auch hier konnte kein negativer Einfluss auf die Überlebensquote festgestellt werden. Alle Proben zeigten ein normales Wachstum der CAM. In den folgenden Experimenten mit künstlichen Schalensystemen wurden 400 µl Kalzium-Laktat in flüssigem Eiklar (0,07 g/ml) und 100 mg gemahlene Eierschalpulvers als künstliche Kalziumquellen, wenn nicht anders erwähnt, standardmäßig eingebracht.

In einem ersten Schritt wurde eine breite Palette an Materialien und Formen ausgewählt, um sie in Kultivierungsexperimenten mit Hühnerembryonen auf ihre grundlegende Eignung als Kulturbehälter zu testen (Abbildung 33). Bei den Kultivierungsexperimenten wurde jeweils das für die Perry-Kultur beschriebene Standardprotokoll angewendet. Grundlegende Eigenschaften an die Kulturbehälter waren Dichtigkeit, Autoklavierbarkeit und mechanische Stabilität. In Summe wurden über 60 verschiedene Gefäße in Kultivierungsexperimenten untersucht. Der Übersicht wegen sei hier nur eine Auswahl der Systeme näher beschrieben und auf die Ergebnistendenzen eingegangen. Vielversprechende Materialien wurden durch Beschichtungen und Anpassen der Geometrie (Schichtdicke und Form) angepasst und erneut im Experiment untersucht. Die Beurteilung der einzelnen Kulturbehältnisse erfolgte anhand der maximalen Überlebensdauer der Embryonen und der durchschnittlichen Überlebensdauer. Die Kontrolle der Embryonen erfolgte täglich, wobei tote Embryonen aus den Experimenten entfernt und Veränderungen dokumentiert wurden.

Aus PDMS (Polydimethylsiloxan, Sylgard[®] 184) wurden Formen mit einem zylindrischen Körper und einem halbkugelförmigen Boden hergestellt (Abbildung 34, links). Die PDMS-Zylinder wurden in einer Höhe von 53 mm, einem Innendurchmesser von 43 mm und einer Wandstärke von 3 mm gegossen. Das verwendete PDMS wurde

im Verhältnis 1:10 (Härter: Monomer) gemischt, entgast und in einer Teflon Form bei 80 °C für drei Stunden ausgehärtet. Anschließend wurden die Formen im Ultraschallbad für 15 Minuten in destilliertem Wasser gereinigt. Nach dem Überführen der Embryonen in die PDMS-Behälter wurden diese mit einer Lage Frischhaltefolie verschlossen. In Kultivierungsexperimenten konnte das maximale Überleben bis Tag 8 gezeigt werden. Die durchschnittliche Überlebensdauer wurde mit 5,1 Tagen berechnet. Die Beschichtung der PDMS-Zylinder mit Eiklar, Agar und Gelatine konnte keine Verbesserung der maximalen sowie durchschnittlichen Entwicklungsdauer bewirken. Ähnlich verliefen die Experimente mit PDMS-Zylinder mit einer Wandstärke von sechs mm. Das maximale Überleben in diesen Behältern wurde mit sieben Tagen und die durchschnittliche Entwicklung mit 4,8 Tagen ermittelt.



Abbildung 33: Auswahl an künstlichen Kulturbedeuten für Hühnerembryonen, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt, aufgebaut und im Kultivierungsexperiment untersucht wurden

Beim Fraunhofer IKTS Dresden wurden Keramikschalen aus Al_2O_3 in verschiedenen Ausführungen in Auftrag gegeben und hergestellt (Abbildung 34, rechts). Die Formen hatten eine Höhe von 60 mm, einen Innendurchmesser von 41 mm und eine Wandstärke von 2 mm. Die Rohlinge wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (1300, 1350 und 1400 °C) gebrannt, was sich in einer unterschiedlichen Rauigkeit der Oberfläche und Porosität äußerte. Die unterschiedlichen Keramikformen wurden in mehreren Experimenten untersucht. Das maximale Überleben wurde mit Tag 9 mit den bei 1350 °C gebrannten Formen erreicht. Die mit 1300 °C gebrannten Formen erreichten Tag 7, die bei 1400 °C gebrannten Tag 8. Die durchschnittliche Entwicklung wurde mit 5,6 Tagen (1350 °C), 4,3 Tagen (1300 °C) und 5,2 Tagen (1400 °C) berechnet. Die Al_2O_3 -Keramiken wurden mit verschiedenen Beschichtungen (Agar, Gelatine, Eiklar) modifiziert. Dies führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der Überlebensdauer. Ebenso wurde auf die Innenseite der bei 1350 °C gebrannten Keramiken eine 3 μm dicke Schicht aus Parylene C[®] aufgebracht, um die Eierschalenmembranen zu kopieren. Die Beschichtung wurde im Fraunhofer IBMT St. Ingbert durchgeführt. Auch diese Beschichtung zeigte keine Erhöhung der maximalen Entwicklung (Tag 5) und der durchschnittlichen Entwicklung (Tag 4,4).

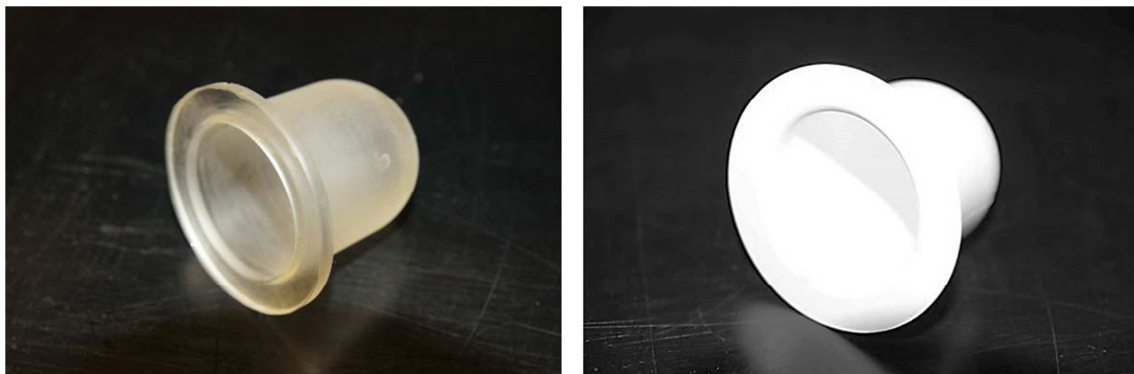


Abbildung 34: Künstliche Kulturbehälter für die Kultivierung des Hühnerembryos aus PDMS (Polydimethylsiloxan) und Al_2O_3 -Keramik. Links: Silikonform aus PDMS, Wandstärke 3 mm. Rechts: Keramikform aus Al_2O_3 gesintert bei 1350 °C

Nachfolgend wurden Filterhülsen aus verschiedenen Materialien (Zellulose, Fiberglas und Quarz) zur experimentellen Eignung im Kultivierungsexperiment herangezogen (Abbildung 35). Der Innendurchmesser betrug bei allen Behältern 40 mm und eine Höhe von 60 mm. Die Form der Behälter war zylindrisch mit einem halbkugelförmigen Boden. Die notwendige Abdichtung erfolgte mit Karnaubawachs und PDMS. Das Wachs wurde auf einer Heizplatte verflüssigt und auf der Innenseite der Behälter in einer Dicke von etwa 80-100 µm aufgebracht. Die PDMS-Beschichtung erfolgte durch Auftragen der Silikonmischung (10:1 Monomer: Härter, Sylgard® 184) auf die Innenseite der Behälter und härtete anschließend für drei Stunden bei 80 °C aus. Zur Kultivierung von Hühnerembryonen erfolgte der Verschluss der Behälter mit Frischhaltefolie.

Die mit Wachs beschichteten Zellulose-Behälter wurden in insgesamt drei Experimenten eingesetzt und erlaubten die Entwicklung der Embryonen bis Tag 8. Die kultivierten Embryonen zeigten eine durchschnittliche Überlebensdauer bis Tag 6,2. Die Fiberglas-Behälter, die mit Wachs beschichteten worden waren, konnten in insgesamt drei Experimenten ebenfalls eine maximale Entwicklung von Tag 8 erreichen und zeigten eine durchschnittliche Überlebensrate von 5,7 Tagen. Die Quarz-Behälter mit Wachsbeschichtung erlaubten hingegen nur eine maximale Entwicklung von 7 Tagen mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 6,0 Tagen. Bei den mit PDMS beschichteten Behältern wurde unabhängig vom Material eine maximale Entwicklung von 7 Tagen beobachtet. Die Embryonen zeigten auch eine sehr ähnliche durchschnittliche Überlebensdauer von 5,2 (Zellulose), 5,3 (Fiberglas) und 5,4 Tagen (Quarz). Die verschiedenen Behältnisse wurden mit weiteren Beschichtungen versehen und in Kultivierungsexperimenten untersucht. Zur Abdichtung wurden AKD-Leim, Parylene® C und Natriummetasilikat (Wasserglas) verwendet. Mit AKD-Leim beschichtete Zellulose-, Quarz- und Fiberglasbehälter zeigten nur geringere maximale Entwicklungszeiten von Tag 4-5, was sich auch in sehr geringen durchschnittlichen Entwicklungen zeigte (3,9; 4,1 und 4,0 für Zellulose, Fiberglas und Quarz). Mit Parylene® C und Wasserglas konnten keine wasserundurchlässigen Beschichtungen erreicht werden. Daher erfolgten mit diesen Behältern keine Kultivierungsexperimente.



Abbildung 35: Künstliche Kulturbehälter für die Kultivierung des Hühnerembryos aus Fiberglas, Zellulose und Quarz. Links: Zellulosehülse beschichtet mit Karnaubawachs, Mitte: Fiberglasshülse beschichtet mit Karnaubawachs, Rechts: Quarzhülse beschichtet mit Silikon (MED 6015)

Als Kulturbehälter wurden, auch wegen der hervorragenden optischen Eigenschaften, Gefäße aus Kunststoff untersucht. Die Kultivierung von Hühnerembryonen in Polyethylen-Behältern konnte bis Tag 5 mit einer durchschnittlichen Entwicklung von 4,2 Tagen durchgeführt werden. Die Behälter wiesen eine dem Ei ähnliche Geometrie auf. In diesen Behältnissen konnte häufig das Adhären des Dotters an der Gefäßwand beobachtet werden, was vermehrt zum Reißen der VM führte. Des Weiteren wurde das Auerbach-Kultursystem untersucht und mit den zu testenden Materialien verglichen [5]. Die laut Literatur mögliche maximale Entwicklung von Tag 20 konnte nicht bestätigt werden. Im Experiment wurde ein Maximum mit Tag 13 ermittelt und eine durchschnittliche Entwicklung bis Tag 7,7. Bei 70 % der abgestorbenen Kulturen konnte der Austritt von Dotter beobachtet werden. Die ausgeprägte Neigung des Dotters an Kunststoff festzukleben, ließ sich auch in weiteren eiförmigen Behältern aus Kunststoff (PET, Polyethylen und Polystyrol) beobachten.

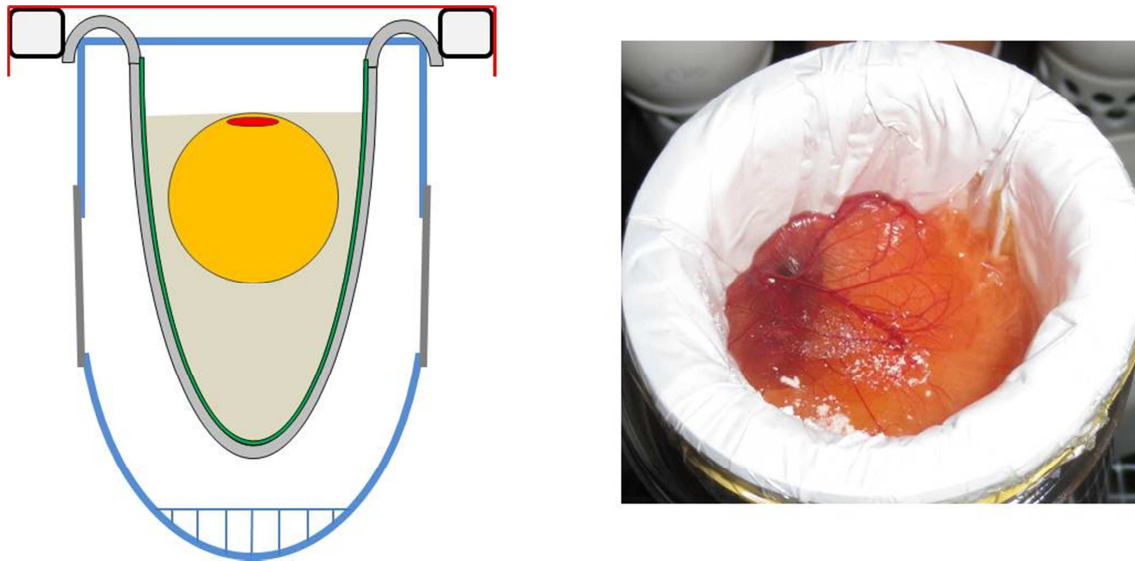


Abbildung 36: Künstliche Kulturbeder für die embryonale Entwicklung des Hühnerembryos in Membranen und Folien. Links: Kultursystem nach Kamihira, angepasst auf das Huhn [51], Glasbehälter mit Öffnungen auf halber Höhe (blau) in den ein Drahtnetz (grau) eingesetzt wurde. Beide werden von einem Ring (weiß) fixiert. Zwischen Netz und Embryo ist die zu testende Membran (grün) eingebracht. Die Kultur wird durch eine Frischhaltefolie (rot) verschlossen, Rechts: Kultivierung eines Hühnerembryos an Tag 9 der Entwicklung in PTFE-Membran mit 500 nm Poren

Mehrere Glasbehälter mit verschiedenen Formen (flach, eiförmig, rund und zylindrisch) wurden ebenfalls zur Kultivierung von Embryonen herangezogen. Die am weitesten fortgeschrittene Entwicklung wurde mit einem runden Kulturbeder (Tag 7) erreicht. Ein durchschnittlicher Entwicklungsfortschritt konnte bei Tag 5,6 errechnet werden. Ähnlich den Kunststoffgefäßen wurde auch bei Glasgefäßen eine Neigung des Dotters an der Gefäßwand anzuhängen beobachtet, was vermehrt zum Einreißen der VM und dem Auslaufen des Dotters führte.

Neben mechanisch festen Strukturen wurden auch Membranen und Folien als mögliche Kulturbeder getestet (Abbildung 36). Vor allem die von Kamihira beschriebene Teflonmembran bot sich zur Testung an [51]. Um eine Kultivierung von Hühnerembryonen durchzuführen, wurde das System nach Kamihira als Vorlage genutzt und in der Größe dem Hühnerei angepasst. Es besteht aus einem geformten Drahtnetz (Höhe 60 mm, Durchmesser 41 mm), das, in einem eigens dafür hergestellten Glasbehälter (Höhe 75 mm, Durchmesser 45 mm) positioniert und am oberen Ende von einem Ring zusammengehalten wird. Der Glasbehälter besitzt Durchbrüche auf halber Höhe (35 mm vom unteren Rand) zur Ventilation und zum Einbringen von Wasser,

welches der Befeuchtung der Kultur dient. Das Kultursystem wurde für Kultivierungs- Kultivierungsexperimente so vorbereitet, dass 2 ml destilliertes Wasser vorgelegt und die zehn Öffnungen im Glas mit einer Lage Teflonband verschlossen wurden. Die zu testende Membran wurde von oben möglichst glatt in das Drahtnetz angelegt. Die Kulturen wurden nach Einsetzen der Embryonen mit einer Lage Frischhaltefolie verschlossen.

Im Experiment wurden Parafilm[®], PTFE-Membranen mit 450 sowie 500 nm Poren (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) untersucht. Die in der Veröffentlichung von Kamihira beschriebene Membran konnte leider nicht getestet werden, da sie nicht in der minimal notwendigen Breite erhältlich war. Die getesteten PTFE-Membranen wurden nach den Parametern dieser Membran ausgewählt. Eine weitestgehend faltenfreie Auskleidung der Kulturform mit Parafilm[®] konnte durch das Vorformen mit einem Teflonstempel erreicht werden. Die maximale Entwicklung lag bei diesen Experimenten bei Tag 13. Die umgesetzten Embryonen zeigten eine durchschnittliche Überlebensdauer von 5,6 Tagen.

Mit den PTFE Membranen konnte keine faltenfreie Auskleidung des Kulturbehälters erreicht werden, da das verwendete PTFE nicht dehnbar ist. Die maximale Entwicklung wurde bei der Membran mit 450 nm Poren an Tag 9 und bei der Membran mit 500 nm Poren an Tag 7 erreicht. Die durchschnittlichen Überlebensdauern lagen bei 5,9 Tagen (450 nm Poren) und 5,6 Tagen (500 nm Poren). Des Weiteren wurde die Frischhaltefolie, mit der die Perry-Kulturen standardmäßig verschlossen wurden, zur Kultivierung getestet. Die Folie wurde wie die oben getesteten Membranen in den Kulturbehältern angewendet und konnte ebenfalls nicht faltenfrei aufgebracht werden. Dieses Material zeigte durch seine Adhäsion an sich selbst deutliche Defizite in der Handhabung. Eine Embryonalentwicklung konnte maximal bis Tag 6 durchgeführt werden. Die durchschnittliche Entwicklung lag hier bei 4,3 Tagen.

Ähnlich den Membranen konnten auch dünne Materialschichten auf formgebenden Stützstrukturen als Kulturbehälter eingesetzt werden. Mit einem 3D-Drucker (Objet500 Connex von Stratasys) wurden solche Stützstrukturen hergestellt. Hierzu wurde VerowhitePlus (Stratasys) als Material verwendet. Die Formen hatten eine Höhe von 57 mm, einen Innendurchmesser von 42 mm und waren der Form des Eies

nachempfunden. Die offene, später durch Silikon abgedichtete Fläche zwischen dem Material lag bei 18,4 % (1225 mm²) der Innenseite. Am oberen Rand war eine Auflage zur Fixierung am Wasserreservoir angebracht. Analog der Glasbehälter im Kamihira-System wurden Kunststoffbehälter als Wasserreservoir mit passenden Ausmaßen in zylindrischer Form hergestellt. Auch diese verfügen über zehn Öffnungen. Diese 3D-Formen wurden in Silikon (MED6015) getaucht und auf diese Weise abgedichtet. Das Silikon wurde für drei Stunden bei 80 °C ausgehärtet und die Beschichtung vor Verwendung im Experiment auf Dichtigkeit hin geprüft. Der am weitesten entwickelte Embryo erreichte Tag 8. Die umgesetzten Embryonen zeigten eine durchschnittliche Überlebensdauer von 5,3 Tagen. Weitere Formen wurden im 3D-Drucker hergestellt, um eine höhere offene Fläche (30,9 % = 2057 mm²) zu erhalten. Außerdem wurde ein anderes, als biokompatible beschriebenes Material (MED610) zur Herstellung verwendet. Die mit diesen Schalen durchgeführten Experimente zeigten ähnliche Ergebnisse wie die zu Beginn der Experimentenreihe getesteten 3D-Formen. Die maximale Entwicklungsdauer wurde mit 8 Tagen erreicht, die durchschnittliche Entwicklungsdauer mit 5,2 errechnet.

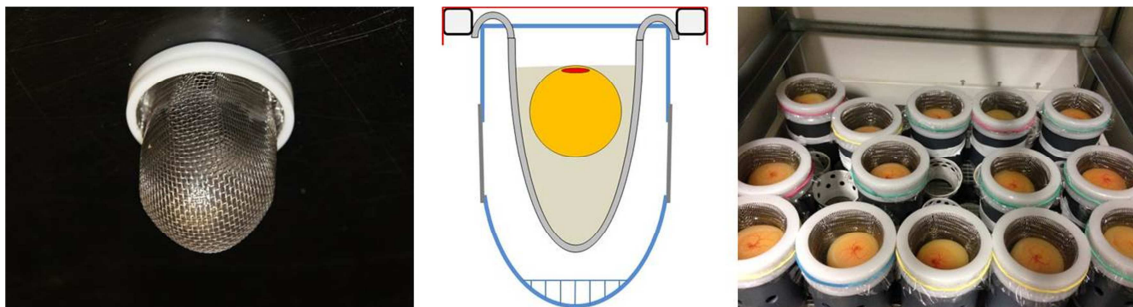


Abbildung 37: Künstliche Kulturbeder für die Kultivierung des Hühnerembryos aus Edelstahlraht mit Silikonbeschichtung. Links: Mit Silikon beschichtetes Stahlnetz mit Haltering, Mitte: Schemazeichnung des Kultursystems. Der Embryo befindet sich zentral im beschichteten Drahtnetz (grau), das im Kunststoffbecher (blau) sitzt. Über den Haltering (weiß) ist zur Abdichtung eine Frischhaltefolie gespannt (rot). Das Wasser im unteren Teil des Bechers verhindert ein Austrocknen des Embryos. Rechts: Bestückte Kultursysteme im Kultivierungsexperiment

Zur Aufbringung einer dünnen Schicht Silikon (MED 6015) wurden Stahlnetze mit einer Drahtstärke von 50 µm und einer Maschenweite von 150 µm verwendet (Abbildung 37). Die Beschichtung mit Silikon erfolgte, analog der Strukturen aus dem

3D-Drucker, im Tauchverfahren. Mit diesen Kulturbehältern konnte eine Entwicklung bis Tag 18 durchgeführt werden. Die durchschnittliche Entwicklung lag bei 8,4 Tagen. Die Untersuchung von Edelstahlnetzen mit Maschenweiten von 500 μm erwies sich als weniger erfolgreich. Eine maximale Entwicklung war bis Tag 8 möglich.

Der Verzicht auf Stützstrukturen, wie beispielsweise das Stahlnetz, würde die Beobachtungsmöglichkeiten verbessern und daher durch die Generierung von dünnwandigen Silikonformen (Abbildung 38) zu erreichen versucht. Dazu wurde ein zylindrischer Teflonstempel mit einem Durchmesser von 40 mm 15 cm tief in Silikon (MED10-6640) eingetaucht und nach dem Abtropfen bei 40 °C für 30 Minuten getrocknet. Nach einem erneuten Tauchen in das Silikon wurde die Vernetzung des Silikons bei 150 °C über 2,5 Stunden vervollständigt. Nach dem Abkühlen konnte eine 200 μm dicke Silikonform vom Stempel abgerollt werden. Um ihn als Kulturbehälter nutzen zu können, wurde er über einen Kunststoffring gezogen, in einen Becher gehängt und mit Frischhaltefolie verschlossen. Mit dieser Kulturform konnte eine maximale Entwicklung von 18 Tagen erreicht werden, wobei die Embryonen eine durchschnittliche Entwicklungsdauer von 12,8 Tagen aufwiesen. Die Beobachtung der Entwicklung war durch die transparente Silikonhülle ebenso wie die fotografische Dokumentation sehr einfach möglich.



Abbildung 38: Künstliche Kulturbehälter für die Kultivierung des Hühnerembryos aus Silikon. Links: Entwicklung an Tag 3, Kulturbehälter in Halterung eingesetzt, Mitte: Entwicklung des Hühnerembryos an Tag 8, Rechts: Entwicklung an Tag 15, Kulturbehälter zur Dokumentation aus Halterung entnommen

Obwohl die mit Silikon abgedichteten Stahlnetze mit einer maximalen Entwicklung von 18 Tagen ein mit den dünnen Silikonformen vergleichbares Ergebnis in den Kultivierungsexperimenten zeigten wurden, letztere wegen ihrer besseren optischen

Eigenschaften und ihrer höheren durchschnittlichen Entwicklung zur Optimierung bevorzugt. Die Kultivierungsexperimente sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Kultivierungsexperimente mit vollständig künstlichen Kulturgefäßen. Maximale und durchschnittliche Entwicklung von Hühnerembryonen in Behältern. Angaben in Tage der Embryonalentwicklung

Gefäß	Maximale Entwicklung, Tage	Durchschnittliche Entwicklung, Tage	Embryonen, Anzahl	Experimente, Anzahl
Al ₂ O ₃ , 3 µm Parylene® C	5	4,4	12	6
PDMS, 3 mm	8	5,1	33	7
Zellulose, Silikon	7	5,2	11	3
Fiberglas, Silikon	7	5,3	12	3
3D Drucker, VeroWhite Silikon	8	5,3	12	5
Quarz, Silikon	7	5,4	11	3
PTFE 500 nm	7	5,6	18	3
Al ₂ O ₃ , bei 1350 °C gebrannt	9	5,6	31	7
Parafilm®	13	5,6	25	3
Fiberglas, Wachs	8	5,7	10	3
PTFE 450 nm	9	5,9	18	4
Quarz, Wachs	7	6,0	11	3
Zellulose, Wachs	8	6,2	11	3
Drahtnetz, Silikon (MED 6015)	18	8,4	55	8
Silikonform (2x, MED10-6640)	18	12,8	33	4

Zunächst wurden nähere Untersuchungen des Materials durchgeführt. Die Kontaktfläche der CAM zur inneren Schalenmembran bildet im Ei die Grenze zwischen dem Embryo und seiner Umwelt. Das Anhaften der CAM an den Kulturbehälter ist ein wichtiger Prozess, die Eigenschaften der Oberfläche somit ein wichtiger Einflussfaktor. In einer Kontaktwinkelmessung (Abbildung 39) wurden die Hydrophilie der

Ergebnisse

Schalenmembran und des verwendeten Silikons bestimmt. Zum Vergleich wurde Glas, als stark hydrophile Substanz, vermessen. Die Messung erfolgte mit einem Dataphysics OCA20 Contact Angle System nach dem unter Material und Methoden beschriebenen Protokoll. Das Glas zeigte zu Wasser einen durchschnittlichen (drei Messungen) Kontaktwinkel von $31,5 \pm 1,3$ °. Die frisch präparierte Schalenmembran verhielt sich relativ hydrophob mit einem Kontaktwinkel von durchschnittlich $129,0 \pm 2,2$ °. Der Kontaktwinkel der Kulturbedälter aus MED10-6640 wurde mit $117,2 \pm 1,8$ ° gemessen. Mit der Analysesoftware (OCA 20) wurde mit der Equation of state-Methode und dem Flüssigkeitsmodell für Wasser nach Ström et al. die Oberflächenenergie berechnet. Der Wert für Glas lag bei $63,8 \pm 0,7$ mN/m. Für die Schalenmembran wurde ein Wert von $7,39 \pm 0,9$, für das Silikon ein Wert von $13,1 \pm 1,0$ mN/m berechnet. Die hydrophilen Eigenschaften der Kulturbedälter sind damit in etwa mit denen der Schalenmembran vergleichbar.

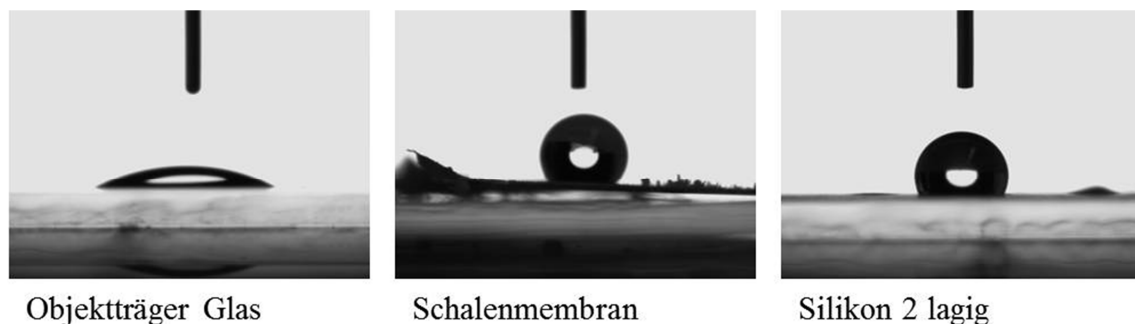


Abbildung 39: Kontaktwinkelmessung mit Wasser auf verschiedenen Oberflächen. Links: Glas, $31,5$ °. Mitte: Frisch präparierte Schalenmembran, $129,0$ °. Rechts: Silikon MED10-6640 2lagig, $117,2$ °

Um das Anwachsen der CAM an die vollständig künstlichen Kulturbedälter vergleichen zu können, wurde dieser Vorgang beim Brutei dokumentiert (Abbildung 40). Hierzu wurden zehn Bruteier inkubiert und täglich die Wachstumsfront der CAM auf der Schale markiert. Bei allen Eiern konnte eine ungleichmäßige Wachstumsfront beobachtet werden. Entgegen der Erwartungen wuchs die CAM nicht gleichmäßig auf das untere Ende des Eies zu, so dass sich die CAM nicht direkt am spitzen Ende des Eies schloss, sondern etwas seitlich davon. Um das durchschnittliche tägliche Wachstum zu beurteilen, wurden drei senkrechte Linien auf der Eierschale gezogen.

Der Schnittpunkt der vorderen Kante der CAM mit diesen Linien ermöglichte es, das durchschnittliche tägliche Wachstum pro Ei zu bestimmen und das ungleichmäßige Wachstum zu berücksichtigen. Die vollständige Bewachung der Kalkschale durch die CAM wurde spätestens an Tag 13 der Bebrütung beobachtet. Auf die gleiche Weise wurden Perry-Kulturen ($n=10$) untersucht. Nach 13 Tagen erfolgte auch hier die vollständige Bedeckung der Schale durch die CAM. Sowohl beim Brutei als auch bei der Perry-Kultur konnte ein relativ gleichbleibendes Wachstum der CAM von 0,5-0,6 cm in 24 Stunden festgestellt werden.

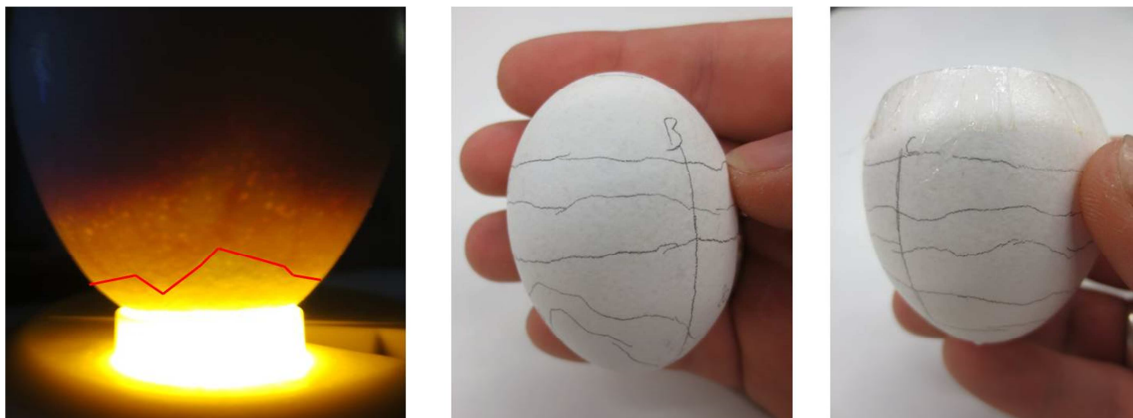


Abbildung 40: Untersuchung des Wachstumsverhaltens der CAM im Brutei und der Perry-Kultur. Die Front der CAM wurde täglich mit Bleistift auf der Schale markiert. Zur Identifizierung wurden die Schalen geschiert. Links: Schieren eines Bruteies an Tag 12 der Inkubation. Die unregelmäßige Wachstumsfront wurde hervorgehoben. Mitte: Der Schnittpunkt der CAM-Front mit den drei senkrechten Linien erlaubte durch Mittelwertbildung die Ermittlung eines Durchschnittswertes pro Ei zu errechnen. Rechts: Verlauf der Wachstumslinie bei einer Perry-Kultur

Eine Möglichkeit zur Optimierung der Kultivierungsergebnisse ist die Veränderung der Dicke des Silikons. Diese Veränderung würde sich unter anderem in erhöhter oder erniedrigter Durchlässigkeit für Gase widerspiegeln. Die im vorangegangenen Abschnitt verwendeten Silikonformen wurden beim Herstellungsprozess zweimal in Silikon getaucht (2x) und hatten eine Dicke von 200 μm . In einem vergleichbaren Prozess wurden Silikonhüllen durch einmaliges Eintauchen (1x) und dreimaliges Eintauchen (3x) hergestellt. Die 1x Silikonhüllen wurden mit einer Dicke von 80-100 μm , die 3x getauchten Silikonhüllen mit 250-300 μm Dicke gemessen. Zunächst erfolgte die Untersuchung des durchschnittlichen 24 Stunden Wachstums der CAM in

Ergebnisse

diesen Formen. Je fünf Kulturen wurden präpariert und inkubiert. Das Wachstum der CAM wurde täglich auf der Silikonhülle markiert und der Durchschnittswert ermittelt. Der Wert wurde auch hier an drei Linien abgelesen, um das auch hier auftretende ungleiche Wachstum zu berücksichtigen. Bis Tag 10 der Entwicklung war das tägliche Wachstum der CAM vergleichbar (0,5-0,6 cm) mit dem der beiden In-ovo-Kulturen. Bis Tag 15 konnte ein immer weiter fortschreitendes Abnehmen des täglichen Wachstums beobachtet werden. Erst drei Tage nach den In-ovo-Kulturen (Tag 16) wurde die vollständige Bedeckung der Silikonoberfläche durch die CAM beobachtet. Die drei Silikonformen zeigten dabei untereinander keine bemerkenswerten Unterschiede.

Tabelle 4: Durchschnittliches 24 Stunden Wachstum der CAM in unterschiedlichen Kultivierungsformen

Tag der Inkubation	Durchschnittliches 24 Stunden Wachstum der CAM, cm				
	Brutei, n=10	Perry-Kultur, n=10	2x Silikon, n=5	1x Silikon, n=5	3x Silikon, n=5
6	0,60±0,17	0,63±0,11	n.a.	n.a.	n.a.
7	0,51±0,18	0,49±0,14	0,62±0,10	0,61±0,07	0,62±0,10
8	0,58±0,12	0,53±0,12	0,58±0,13	0,61±0,07	0,58±0,13
9	0,62±0,14	0,61±0,17	0,59±0,16	0,58±0,07	0,59±0,16
10	0,51±0,18	0,52±0,12	0,56±0,18	0,55±0,05	0,56±0,18
11	0,65±0,21	0,67±0,21	0,38±0,04	0,43±0,09	0,38±0,04
12	0,56±0,31	0,55±0,29	0,28±0,05	0,34±0,11	0,28±0,06
13	umwachsen	umwachsen	0,21±0,16	0,22±0,07	0,21±0,16
14	umwachsen	umwachsen	0,15±0,09	0,08±0,13	0,15±0,09
15	umwachsen	umwachsen	0,07±0,06	0,05±0,05	0,10±0,05
16	umwachsen	umwachsen	umwachsen	umwachsen	umwachsen

In einer selbst entwickelten und gebauten Diffusionskammer wurde die Durchlässigkeit der drei Silikonhüllen für Sauerstoff untersucht (Abbildung 41). Die Diffusionskammer bestand aus zwei gasdichten Kammern, die über einen Kanal miteinander verbunden wurden. In diese Verbindung wurde das zu testende Material eingespannt. Sauerstoff

wurde aus einem Sauerstoffkonzentrator (Everflow OPI, Philips Respironics) mit einem Fluss von 1 L/min in die untere Kammer eingebracht. In der oberen Kammer wurde die Sauerstoffkonzentration in regelmäßigen Abständen gemessen (Greisinger, GOX 100). Vor Beginn der Messung wurde der Sensor auf die 21,0 % der Umgebungsluft kalibriert. Jede Messung wurde dreimal mit unterschiedlichen Proben über einen ähnlichen Zeitraum durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine vergleichende Messung.

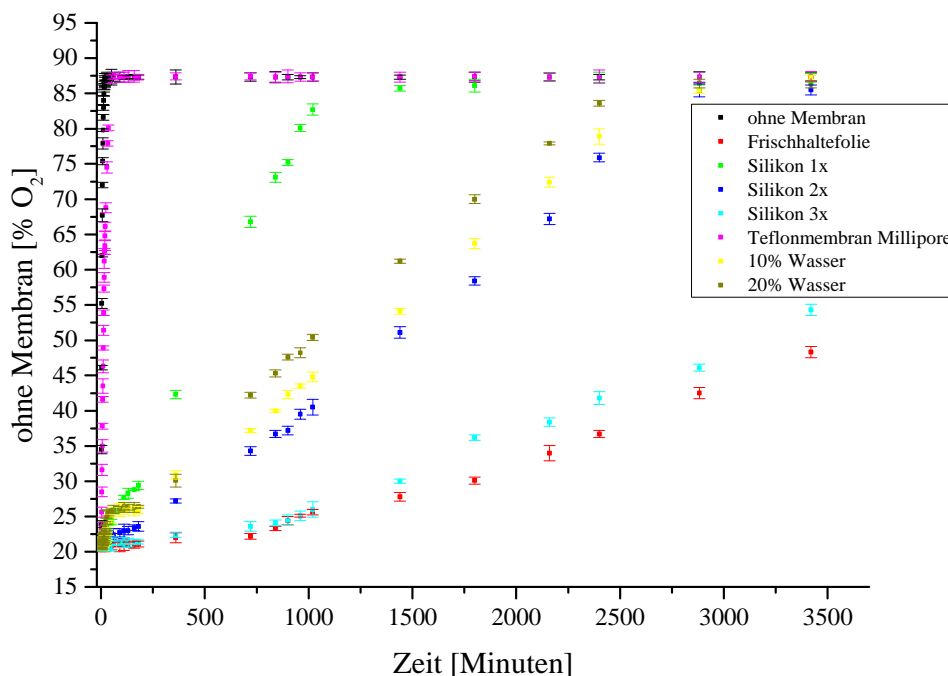


Abbildung 41: Sauerstoffdiffusion durch verschiedene Materialien für vollständig künstliche Kulturbehälter. Gemessen wurde die Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Luftraum durch Diffusion über die verschiedenen Materialien bei einer Flussrate von 1 L/min

Zunächst wurde die Kontrolle ohne Probe gemessen. Bereits nach 15 Minuten konnte eine Sättigung der Sauerstoffkonzentration bei 87,3 % festgestellt werden, was laut Herstellerangaben im Schwankungsbereich des Gerätes liegt (87-96 %). Die Teflonmembran, die im künstlichen Inkubationssystem von Kamihira verwendet wurde, bildete lediglich eine geringe Barriere für den Sauerstoff. Der Konzentrationsverlauf des

Sauerstoffs verlief annähernd gleich dem Versuch ohne Membran um drei Minuten verzögert. Die Diffusion von Sauerstoff über die Frischhaltefolie konnte erst nach 180 Minuten festgestellt werden, eine Sättigung der Sauerstoffkonzentration im gemessenen Zeitraum trat nicht ein. Ähnliche verlief das Experiment bei den 3x Silikonproben. Die Sättigung der Sauerstoffkonzentration bei den 2x Silikon-Proben erfolgte nach 2700 Minuten, die der 1x Silikon Probe nach 1100 Minuten. Als weitere Vergleichsprobe wurden Silikonformen hergestellt, die während der Herstellung mit 10 bzw. 20 % Wasser gemischt wurden. Die erhoffte Erhöhung der Durchlässigkeit des Silikons durch den Zusatz von Wasser konnte erreicht werden. Mit 10 % zugesetztem Wasser wurde die Sättigung nach 2600 Minuten, mit 20 % Wasser nach 2500 Minuten erreicht.

Die weitere Untersuchung der Silikonhüllen erfolgte in Kultivierungsexperimenten. In jeweils zwei Experimenten wurden Embryonen in 1x und 3x Silikonhüllen nach Standardprotokoll inkubiert und die maximale sowie die durchschnittliche Entwicklung bestimmt. Mit den dünnen (1x) Silikonformen konnte eine maximale Entwicklung von 17 Tagen erreicht werden, womit die Entwicklung hinter der maximalen Entwicklung der 2x Formen von 18 Tagen zurückblieb. Die durchschnittliche Entwicklung von 12,4 (1x) und 12,8 (2x) liegen in einem vergleichbaren Rahmen. Sowohl die maximale Entwicklung (16 Tage) als auch die durchschnittliche Entwicklung (9,2 Tage) blieben bei den 3x Silikonformen hinter den Ergebnissen der anderen zurück.

Um eine Verbesserung der Kultivierungsergebnisse zu erreichen, wurden Änderungen des Inkubationsprotokolls sowie Modifikationen der Kulturbedeckungen untersucht. Eine Möglichkeit hierzu wurde in der Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im Inkubator vermutet. Hierzu wurde mit zwei Sauerstoffkonzentratoren (Everflow OPI, Philips Respironics) die maximal erreichbare Sauerstoffkonzentration im Schlupfinkubator festgestellt. Die Messung der Sauerstoffkonzentration wurde mit einem Sauerstoffsensordurchgeführt. Eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration von 21,0 % in der Umgebungsluft auf bis zu 53,6 % konnte mit der maximalen Leistung (12 L/Minute) der Sauerstoffkonzentratoren erreicht werden. Für eine stufenweise Erhöhung der Sauerstoffkonzentration wurden zusätzlich Zwischenwerte ermittelt. Mit einem Sauerstofffluss von 6 L/Minute wurde eine Konzentration von 36,0 % erreicht, mit einem Fluss von 9 L/Minute eine Konzentration von 44,7 %. Im Kultivierungsexperiment wurden drei Begasungsprotokolle untersucht, die eine

Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Inkubator um eine, zwei oder drei Stufen beinhalten. Diese sahen eine Kultivierung in 36,0 % O₂ ab Tag 12 vor. Im zwei und dreistufigen Protokoll wurde an Tag 16 die Konzentration auf 44,7 % O₂ erhöht. Ab Tag 18 erfolgte beim dreistufigen Protokoll eine dritte Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf 53,6 %. Zusätzlich wurden an Tag 12, 14 und 16 mit einer 20 G Kanüle jeweils ein Loch in die abdeckende Folie gestoßen.

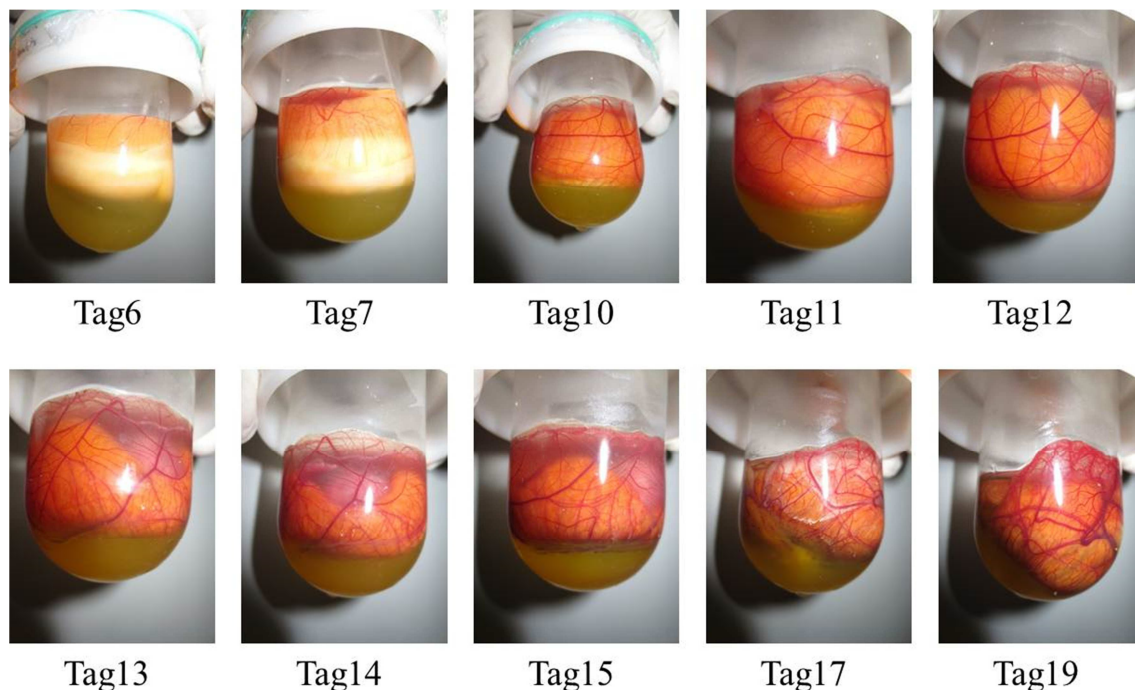


Abbildung 42: Entwicklung des Hühnerembryos im vollständig künstlichen Kulturbehälter. 2x Silikonformen mit einer Wandstärke von 200 µm inkubiert mit zweistufigem Sauerstoffprotokoll. Maximale Entwicklung war hier Tag 20,5. Die Blutentleerung der CAM und das selbstständige Durchstoßen dieser mit dem Schnabel konnte bei diesem Ansatz wiederholt beobachtet werden

Die Kultivierung der drei unterschiedlich dicken Silikonformen erfolgte zunächst mit dem zweistufigen Sauerstoff-Protokoll. Bei den 2x und 3x Silikonformen konnte durch die Begasung mit Sauerstoff eine deutliche Verbesserung der Kultivierungsparameter erreicht werden. Die Kulturen in den 3x Formen erreichten durch die Zugabe von Sauerstoff eine um zwei Tage höhere maximale Entwicklung (Tag 18). Auch die durchschnittliche Entwicklung konnte von 9,2 auf 13,9 Tage erhöht werden. Bei den 2x Formen konnte die durchschnittliche Entwicklung von 12,8 auf 14,0 Tage verbessert

Ergebnisse

werden. Die maximale Entwicklung konnte bis Tag 20,5 vorangetrieben werden, wobei erstmals die Rückbildung der CAM (Entfernung des Blutes aus der CAM) sowie das selbstständige Durchstoßen der CAM durch das Küken beobachtet werden konnte (Abbildung 42). Die Untersuchung der insgesamt drei Embryonen, die dieses Entwicklungsstadium erreichten, zeigte eine leichte Retardierung in ihrer Entwicklung. Sie wurden nach den Kriterien von Hamburger und Hamilton auf HH-Stage 45 eingestuft, was dem Entwicklungstag 19-20 entspricht. Bei der Kultivierung von Hühnerembryonen in 1x Silikonformen mit dem zweistufigen Protokoll konnte keine Verbesserung der maximalen Entwicklung oder der durchschnittlichen Entwicklung, verglichen zum Standardprotokoll, festgestellt werden. Die Testung des einstufigen Begasungsprotokolls wurde mit 2x Formen in drei Experimenten durchgeführt. Die maximale Entwicklung wurde mit Tag 20 und die durchschnittliche Entwicklung mit 13,8 Tagen erreicht. Auch das dreistufige Begasungsprotokoll wurde nur mit den 2x Silikonbehältern durchgeführt. In drei Experimenten mit 87 Embryonen konnte eine maximale Entwicklung von 20 Tagen und eine durchschnittliche Entwicklung von 11,8 Tagen ermittelt werden. Damit zeigte das zweistufige Begasungsprotokoll die besten Ergebnisse.

Tabelle 5: Kultivierungsexperimente mit vollständig künstlichen Kulturgefäßen. Maximale und durchschnittliche Entwicklung von Hühnerembryonen bei verschiedenen Modifikationen und Inkubationsprotokollen. Angaben in Tage der Embryonalentwicklung

Gefäß	Modifikation	Protokoll	Maximale Entwicklung, Tage	Durchschnittliche Entwicklung, Tage	Embryonen, Anzahl	Experimente, Anzahl
1x	-	Standard	17	12,4	21	2
2x	-	Standard	18	12,8	33	4
3x	-	Standard	16	9,2	34	2
1x	Sigmacote®	O ₂ 2 Stufen	19	14,3	12	2
2x	Sigmacote®	O ₂ 2 Stufen	19	12,7	30	3
3x	Sigmacote®	O ₂ 2 Stufen	17	11,8	23	2
1x	FKS	O ₂ 2 Stufen	17	10,8	20	2
2x	FKS	O ₂ 2 Stufen	18	10,5	17	2

3x	FKS	O ₂ 2 Stufen	16	12,3	19	2
1x	Hühnerserum	O ₂ 2 Stufen	17	11,2	18	2
2x	Hühnerserum	O ₂ 2 Stufen	19	10,0	24	2
3x	Hühnerserum	O ₂ 2 Stufen	17	10,9	17	2
1x	-	O ₂ 2 Stufen	17	12,1	13	2
2x	-	O ₂ 2 Stufen	20,5	14,0	66	3
3x	-	O ₂ 2 Stufen	18	13,9	12	2
2x	-	O ₂ 1 Stufe	20	13,8	39	3
2x	-	O ₂ 3 Stufen	20	11,8	87	3
2x	Drahtnetz als externe Stütze	O ₂ 2 Stufen	20	12,5	14	1
2x	10% Wasser in Silikon	O ₂ 2 Stufen	19	12,8	20	2
2x	20% Wasser in Silikon	O ₂ 2 Stufen	17	11,0	12	2
2x	10% Wasser in Silikon	Standard	18	10,7	31	2
2x	20% Wasser in Silikon	Standard	17	11,2	16	2

Nachdem sich die Sauerstoffbegasungsprotokolle als positiv für die Entwicklung der Embryonen herausgestellt hatten, wurde das 2-stufige Protokoll im weiteren Verlauf der Optimierungen übernommen. Obwohl die Silikonoberfläche gut von der CAM überwachsen wurde, stellte sich die Frage, ob das Überleben des Embryos bis zum Schlupf über eine Beschichtung des Silikons erreichbar wäre. Daher wurden die Silikonformen mit drei unterschiedlichen Beschichtungen versehen und im Kultivierungsexperiment evaluiert.

Die Beschichtung mit Sigmacote[®] bewirkt eine Hydrophobierung der Oberfläche und wird standardmäßig in der Kultivierung von Zellsphäroiden eingesetzt. Da die Hydrophobizität der Silikonformen in den Kontaktwinkelmessungen noch unter der von Schalenmembranen lag, erschien diese Behandlung zielführend. Nur bei der

Ergebnisse

Kultivierung in 1x Formen konnte eine Verlängerung der maximalen Entwicklung von Tag 17 ohne Beschichtung auf Tag 19 mit Beschichtung erreicht werden, die sich auch in der durchschnittlichen Entwicklung widerspiegelte (12,1 Tage ohne zu 14,3 Tagen mit Beschichtung). Bei den 2x und 3x Formen konnten die maximalen und durchschnittlichen Entwicklungen ohne Beschichtung nicht erreicht werden. Die Werte blieben mit Sigmacote® bis zu einem Tag hinter denen der Silikonformen ohne Beschichtung zurück (2x: max. Tag 19 Ø 12,7 Tage, 3x: max. Tag 17, Ø 11,8 Tage).

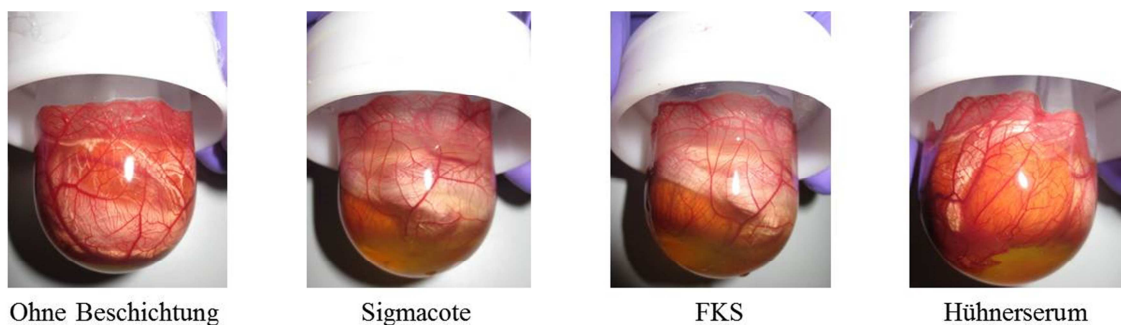


Abbildung 43: Auswirkung von Beschichtungen des Kulturbehälters auf die Entwicklung der CAM. Gezeigt sind Hühnerembryonen in 2x Silikonformen an Tag 17 der Entwicklung mit unterschiedlichen Beschichtungen. Von links nach rechts: ohne Beschichtung, Sigmacote®, Fötales Kälberserum (FKS) und Hühnerserum

Die zweite untersuchte Beschichtung war fötales Kälberserum (FKS). Die Beschichtung der künstlichen Oberfläche mit einer biologischen Proteinmatrix wurde wegen der chemischen Ähnlichkeit zu den Schalenmembranen des Eies gewählt. Auch die Ergebnisse dieser Beschichtung blieben hinter denen ohne Beschichtung zurück. Die maximale Entwicklung der 2x Kulturen mit FKS-Beschichtung wurde lediglich mit Tag 18, die durchschnittliche Entwicklung mit 10,5 Tagen gemessen. Erneut zeigten die 2x Behälter bessere Resultate als die 1x und 3x Behälter. Um einen eventuellen Effekt, der durch die unterschiedlichen Spezies (Rind und Huhn) hervorgerufen wurde, auszuschließen, wurde eine Beschichtung mit Hühnerserum durchgeführt. Die Beschichtung verlief analog der FKS-Beschichtung. Zwar konnten mit der Hühnerserum-Beschichtung bessere Ergebnisse als mit der FKS-Beschichtung erzielt werden, (2x maximale Entwicklung bis Tag 19 statt Tag 18 mit FKS) doch blieben

diese erneut hinter den Silikonbehältern ohne Beschichtung zurück. Wiederholt zeigten die 2x Gefäße bessere Ergebnisse als die 1x und 3x Silikonformen.

Während der Kultivierungsexperimente wurde das Wachstum der CAM bei den unterschiedlichen Beschichtungen beobachtet und miteinander verglichen (Abbildung 43). Sowohl im Verlauf der Wachstumsgrenze als auch in der Ausprägung der CAM (Dicke der Blutgefäße, Dichte der Gefäße) führte keine der Beschichtungen zu einer Verbesserung. Alle zeigten ein unsymmetrisches aber gleichmäßiges Wachstum, wie bereits bei Bruteiern und Perry-Kultur beschrieben. Festgestellt wurde die Verzögerung des vollständigen Umwachsens des Kulturbedälters durch die CAM um einen Tag. Dieser Effekt trat bei allen Beschichtungen gleichermaßen auf.

Wie in vorangegangenen Experimenten erkannt wurde, ist die regelmäßige Wendung für die vollständige Entwicklung der Embryonen wichtig. Da die Silikonbehälter sich durch eine hohe Elastizität auszeichnen, kann angenommen werden, dass die Wendung nicht vollständig auf den Embryo übertragen wird. Diese Hypothese wurde im Kultivierungsexperiment untersucht. Hierzu wurde die 2x Silikonform auf der Außenseite eines Edelstahlnetzes mit großer Maschenweite so umgeben, dass die Wendebewegung sicher auf den Embryo übertragen wurde. Es zeigte sich, dass diese Maßnahme keinen Effekt auf die Kultivierungsparameter hatte. Die maximale Entwicklung wurde mit Tag 20 festgestellt, die durchschnittliche Entwicklung mit 12,5 Tagen.

Zuletzt wurde versucht, die Silikonschicht durch das Zusetzen von Wasser während der Herstellung der Silikonformen poröser zu gestalten. Eine Form wurde mit 10 %, eine mit 20 % Wasser (w/w) hergestellt. Die Formen wurden zweimal getaucht und hatten eine Dicke von 80-100 μm . Von den reinen Silikonformen unterschieden sich die mit Wasser versetzten durch eine optische Trübung sowie den Einschluss von kleinen Bläschen im Material. Wie bereits beschrieben, zeigten die Wasserformen eine etwas bessere Sauerstoffdurchlässigkeit als die reinen Silikonformen. Die Wasserformen wurden jeweils mit und ohne Sauerstoffzufuhr (2-stufiges Protokoll) im Schlupfexperiment evaluiert. Die 10 % Formen erreichten mit Sauerstoff eine maximale Entwicklung von 19 Tagen, ohne Sauerstoff 18 Tage. Die durchschnittliche Entwicklungsdauer berechnete sich auf 12,8 Tage mit und 10,7 Tage ohne Sauerstoff.

Ähnlich verhielten sich die Ergebnisse der 20 % Formen. Mit 17 bzw. 18 Tagen maximaler Entwicklung und 11 bzw. 11,2 Tagen durchschnittlicher Entwicklung (erster Wert mit Sauerstoffgabe) konnte auch hier kein Schlupf erreicht werden.

Zwar konnte das Ziel, ein vollständig artifizielles Kultivierungssystem mit der Möglichkeit zum Schlupf eines gesunden Küken zu entwickeln, nicht erreicht werden, doch wurde ein Kultivierungssystem entwickelt, welches derzeit weltweit als das Beste seiner Art gelten muss. Die 2x Silikonformen inkubiert mit dem 2-stufigen Sauerstoffprotokoll erreichten in ihrer Entwicklung Tag 20,5. Außerdem wurde mit einer durchschnittlichen Entwicklung von 14,0 Tagen einer der höchsten Werte der gesamten Untersuchung erzielt. Momentan ist kein anderes vollständig künstliches Kultivierungssystem für den Hühnerembryo bekannt, das auch nur annähernd diese Werte zu erreichen vermag. Die Kamihira Experimente konnten trotz vieler Ansätze weder in dieser Arbeit noch von anderen Autoren wiederholt werden. Daher darf dieses System im Vergleich nicht gewertet werden.

3.2 Biologische Untersuchungen

Nachdem die technischen Voraussetzungen für die experimentellen Arbeiten mit dem Hühnerembryo geschaffen wurden, erfolgte die Untersuchung der Eignung des Hühnereies zur Kultivierung von Fremdzellen und Fremdgeweben. Diese Eignung ist essentiell wichtig, da die Zell- und Gewebekultur das Tissue Engineering mit humanem Material erlauben muss. Könnte im Vogelei keine Kultivierung von Säugetierzellen durchgeführt werden, so wäre der Ansatz dieser Arbeit als nicht durchführbar zu bewerten.

3.2.1 Eignung des Hühnereies für die Kultivierung von Fremdzellen

Obwohl das Hühnerei in der Vergangenheit für wissenschaftliche Studien intensiv genutzt wurde, finden sich zum Thema Kultivierung von Fremdzellen im Ei nur wenige Informationen. Der Vorgang der Embryogenese mit dem Ablauf komplexer Zelldifferenzierungen und Proliferationen lässt zwar eine Zellkompatibilität der meisten Eikomponenten erwarten, doch gilt es, dies zunächst nach den einzelnen Komponenten

aufgetrennt zu überprüfen. Zielführend erschien es, die Durchführung der Einzelschritte der In-vitro-Kultivierung von Zellen (Anwachsen, Kultivierung, Passagieren) sowie die Differenzierung experimentell durchzuführen. Die Komponenten des Hühnereies lassen sich in zwei Klassen einteilen: Diejenigen, die unter In-vitro-Bedingungen untersucht werden können (Vitellinmembran, Eiklar, Dotter) und diejenigen, die unter In-ovo-Bedingungen untersucht werden müssen (CAM, Amnion, Allantois), da es sich um lebendes Gewebe handelt, welches ohne den Embryo schnell seine Eigenschaften verliert und degeneriert.

Die erste zu untersuchende Komponente des Hühnereis sollte die Vitellinmembran (VM) sein. Die VM bildet in den ersten Tagen nach Beginn der Bebrütung das Kultursubstrat für den Embryo, also den Untergrund auf dem die Zellen wachsen. Diese sphärische Struktur umschließt den kugelförmigen Dotter zum Zeitpunkt der Eiablage vollständig. Für eine bessere Dokumentation der In-vitro-Zellkultur ist es von Vorteil, eine möglichst ebene Oberfläche zur Kultivierung der Zellen zu nutzen. Die VM in eine annähernd ebene Form zu bringen, ist nicht trivial, weswegen zur Präparation der VM eigens ein spezielles Protokoll entwickelt wurde. Dieses neuartige Kultivierungssystem ist unter Material und Methoden beschrieben. Wesentlich umfasst es die Öffnung der VM und das Auswaschen des Dotters mit PBS. Zur Vermeidung von Faltenbildung und dem möglichst ebenen Aufspannen der VM wurde eine eigene Handhabungs- und Kultivierungsform entwickelt und etabliert. Dies ist ebenfalls bei Material und Methoden detailliert beschrieben.

Die Oberfläche der VM ist von besonderem Interesse, da sie bei der Kultivierung die Kontaktfläche der Zellen bildet. Zur Darstellung dieser wurden rasterelektronenmikroskopische sowie Aufnahmen mit dem Durchlichtmikroskop angefertigt (Abbildung 44). Hierbei zeigte sich eine hochgeordnete Mikrostruktur mit unterschiedlicher Ausprägung auf der Innen- und Außenseite. Die VM zeigte bereits im Durchlichtmikroskop eine sehr regelmäßige Struktur, welche die mikroskopische Erkennung von Zellen erschwert. Die Innenseite der VM lässt in der REM-Aufnahme eine hochgeordnete Faserstruktur mit Poren von einem Durchmesser $<1 \mu\text{m}$ erkennen. Die Außenseite wies weniger klar voneinander trennbare Fasern mit einer höheren Rauigkeit auf. Diese Asymmetrie zwischen Außen- und Innenseite war im Hinblick auf die Funktion der VM zu erwarten.

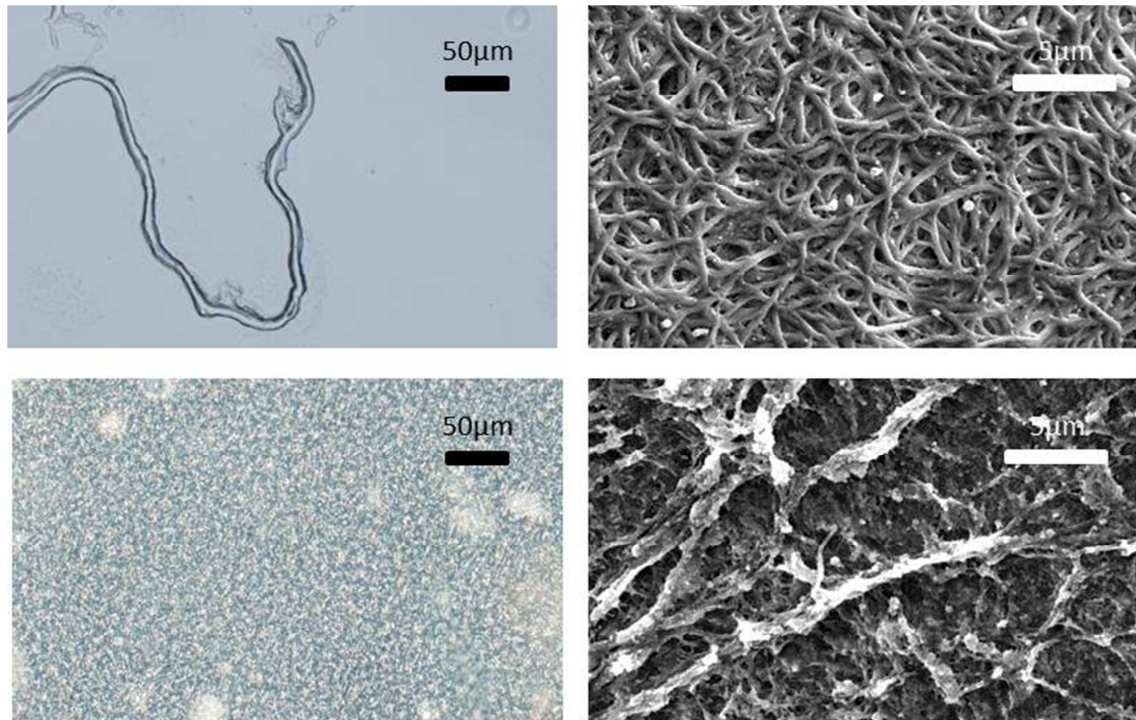


Abbildung 44: Detailaufnahmen der Vitellinmembran (VM) des unbebrüteten Hühnereies. Links oben: Durchlichtaufnahme der längs geschnittenen VM (Kryoschnitt). Links unten: Phasenkontrastaufnahme der VM in planarer Form. Rechts oben: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme der Innenseite der VM. Rechts unten: REM-Aufnahmen der Außenseite der VM

Zum Nachweis der grundlegenden Eignung der VM zur Zellkultur wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt, die als recht grobe Methode jedoch einen zellschädigenden Effekt aufzeigen können (Abbildung 45). Von mehreren frisch präparierten Membranen wurden Extrakte durch 24 stündiges Einlegen der VM bei 37,0 °C in Zellkulturmedium hergestellt und diese als Testsubstanz im WST- und BrdU-Assay verwendet. Zusätzlich wurde eine L/T-Färbung mit der VM durchgeführt. Auf Kulturen, bei denen die Zellen mit der Membraninnenseite sowie der Außenseite in Kontakt standen, wurden hierzu L929 (10000 Zellen/cm²) für 24 Stunden kultiviert und anschließend eine L/T-Färbung durchgeführt. Von den ausgewerteten Zellen wurden auf der Innenseite 97,4±1,8 % und auf der Außenseite 96,8±2,4 % FDA gefärbt. Im WST-Test konnte mit 98,4±5,2 %, bezogen auf die Kontrolle (100±3,1 %), kein negativer Einfluss der VM auf die Zellen nachgewiesen werden. Der BrdU-Test zeigte mit einem Wert von 97,1±6,2 % (100±8,0 % Kontrolle) ein ähnliches Ergebnis.

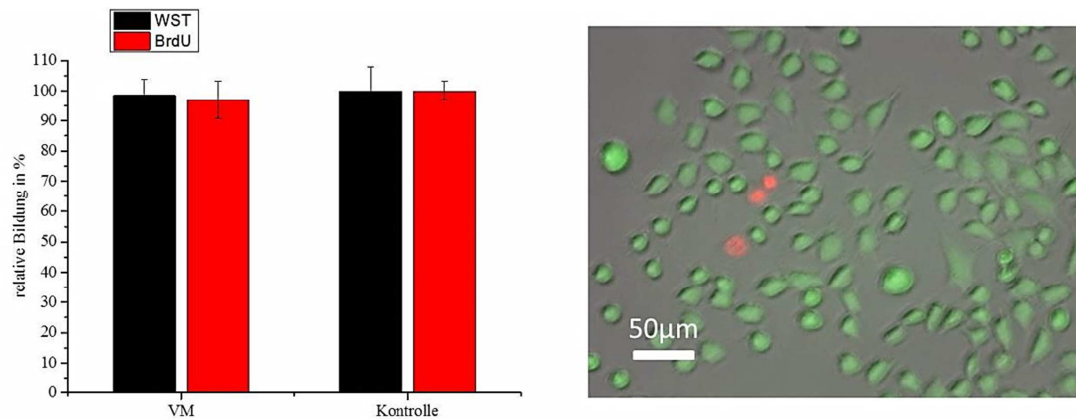


Abbildung 45: Zytotoxizitätstests mit Extrakten Vitellinmembran (VM). Balkendiagramm, links: WST- und BRDU-Assay, VM wurde mit einem 24 Stunden Extrakt (Zellkulturmedium) der VM durchgeführt, Kontrolle wurde mit Zellkulturmedium durchgeführt. Rechts: L-/T-Färbung von L929, die für 24 Stunden auf der VM kultiviert wurden

Mit hMSC, die auf der VM kultiviert wurden, erfolgte die Untersuchung des Anwachsverhalten auf der Innen- (n=6) sowie Außenseite der VM (n=6). Als Vergleich dienten auf Polystyrol (n=12) kultivierte hMSC. 10000 Zellen/cm² wurden für 24 Stunden inkubiert, die Kulturen mit DAPI gefärbt und die Zellen gezählt. Die Anzahl der Zellen in der Kontrolle wurde auf 100,0±2,4 % normiert, um sie besser vergleichen zu können. Auf der Innenseite der VM konnte mit 98,5±4,8 % fast die gleiche Menge von Zellen wiedergefunden werden, als auf dem Polystyrol. Auf der Außenseite wurden mit 68,3±4,5 % deutlich weniger Zellen identifiziert.

Die Untersuchung der Passagierbarkeit von Zellen, die auf der VM kultiviert wurden, war wegen der Proteinstruktur der VM besonders interessant. Es war zu erwarten, dass die standardmäßige Ablösung mit Enzymen durch eine kompetitive Hemmung zwischen den Adhäsionsmolekülen der Zelle und den Proteinen der VM gestört würden. Im Experiment wurden 10000 hMSC/cm² auf der Innenseite- (n=10) und der Außenseite der VM (n=10) für 48 Stunden kultiviert, das Medium entfernt und die Kulturen mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen wurde mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %), Acutase (1x) und Collagenase P (2,5 mg/ml) durchgeführt, anschließend die Zeit bis zur Ablösung bestimmt. Als Kontrolle dienten Kulturen von hMSC auf Polystyrol. Für jede Seite der VM und für jedes Enzym wurden drei Messungen durchgeführt.

In den Kontrollmessungen konnte mit Trypsin/EDTA nach 2,5 Minuten, mit Acutase nach 3,0 Minuten und mit Collagenase P nach 2,0 Minuten eine Ablösung der Zellen erreicht werden. Die Ablösung von der VM mit Trypsin/EDTA erfolgte nach 25,0 Minuten. Mit Acutase und Collagenase P konnte nach jeweils 30,0 Minuten eine Ablösung von der VM erreicht werden. Einen Unterschied der Ablösedauer zwischen der Innen- und Außenseite der VM konnte bei keiner Messung festgestellt werden. Trotz der im Vergleich zur Kontrolle deutlich verlängerten Ablösezeit zeigt das Experiment aber eine prinzipielle Durchführbarkeit einer Zellpassage an.

Die Langzeitkultivierung über mehrere Wochen bildet den zentralen Nachweis der Eignung der VM als Zellkultursubstrat. Sowohl L929 als auch hMSC wurden auf beiden Seiten der VM kultiviert. L929 wurden mit 3000 Zellen/cm² eingesetzt und an jedem zweiten Tag ein Mediumswechsel durchgeführt. Die Passage wurde einmal pro Woche mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) durchgeführt. Die Kultivierung von L929 konnte erfolgreich über 21 Tage durchgeführt werden und die Zellen zeigten eine mit der Kontrolle vergleichbare Morphologie. Zur Langzeitkultivierung der hMSC wurden 3000 Zellen/cm² eingesät und das Medium ebenfalls jeden zweiten Tag gewechselt. Die Passage wurde nach acht Tagen Kultivierung durchgeführt. Auch die Kultivierung von hMSC konnte für 21 Tage erfolgreich durchgeführt werden. Morphologisch konnte auch mit den hMSC kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden.

Als Modell der Differenzierung als komplexe biochemische Reaktion der Zellen wurde die adipogene Differenzierung von hMSC gewählt, da ihr Fortschritt auch auf weniger idealen Oberflächen wie der VM einfach feststellbar ist. Die Differenzierung wurde auf beiden Seiten der VM durchgeführt (je n=12), da wie früher bereits erwähnt unterschiedliche Ergebnisse für möglich erachtet wurden (Abbildung 46). Sowohl eine Positiv- (hMSC auf Polystyrol mit Differenzierungsmedium, n=6) als auch eine Negativkontrolle (hMSC auf Polystyrol mit Kulturmedium, n=4) in 6-Loch-Platten wurde parallel mitgeführt.

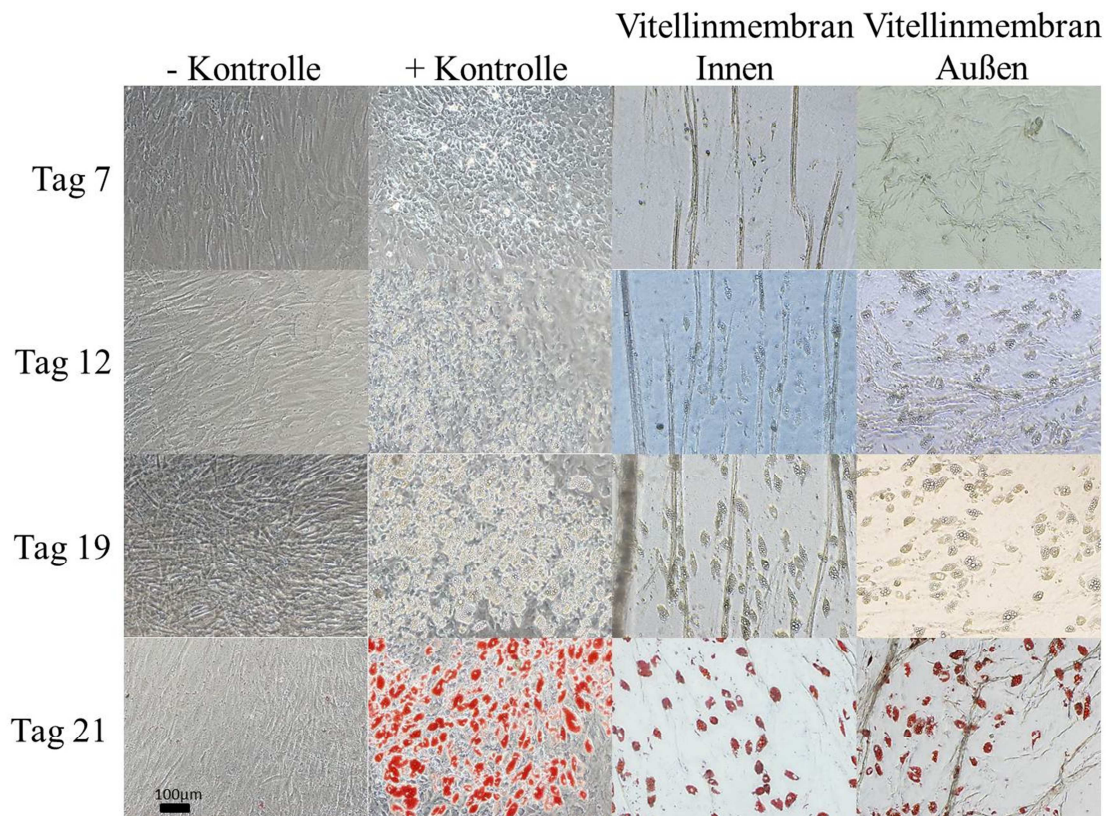


Abbildung 46: Adipogene Differenzierung von hMSC auf der Vitellinmembran (VM). -Kontrolle: hMSC mit Kulturmedium auf Polystyrol. +Kontrolle: hMSC auf Polystyrol mit adipogenem Differenzierungsmedium. VM innen: hMSC auf der VM Innenseite mit adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. VM außen: hMSC auf der Außenseite der VM kultiviert mit adipogenem Differenzierungsmedium. Färbung der Zellen an Tag 21 mit Oil Red O

Die hMSC wurden in einer Konzentration von $10000 \text{ Zellen/cm}^2$ in die Kulturen eingesetzt. Das Differenzierungs- bzw. Kultivierungsmedium wurde nach zwei Tagen gewechselt. Bei allen mit Differenzierungsmedium kultivierten Proben konnten bereits nach sieben Tagen Fettvesikel als erste Anzeichen einer Differenzierung festgestellt werden. Die Oil-Red-O-Färbung an Tag 21 des Experimentes zeigte bei allen Differenzierungsansätzen mit rot gefärbten Vesikeln die erfolgreiche Differenzierung an. Hierbei konnte festgestellt werden, dass bei den Zellen, die auf der VM kultiviert wurden, weniger, dafür aber größere Vesikel pro Zelle zu finden waren (Tabelle 6). Diese Beobachtung wies auf einen die adipogene Reifung beschleunigenden Effekt hin. Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurden bei den unterschiedlichen Ansätzen die Anzahl der Fettvesikel pro Zellen gezählt und der Durchmesser des größten Vesikels

Ergebnisse

pro Zelle gemessen. Die Anzahl ist ebenso wie die Größe des größten Vesikels ein Maß für das Fortschreiten der Entwicklung vom unreifen zum reifen Adipozyt. Unreife Adipozyten zeichnen sich durch viele kleine Fettvesikel aus, wohingegen reife Adipozyten wenige sehr große Fettvesikel beinhalten.

Tabelle 6: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von Fettvesikeln pro Zelle und dem Durchmesser des größten Fettvesikel pro Zelle in adipogen differenzierten hMSC nach 21 Tagen auf verschiedenen Kultursubstraten

Kultursubstrat	Durchschnittliche Anzahl der Vesikel pro Zelle	Durchmesser des größten Vesikel pro Zell , μm	Ausgewertete Zellen, Anzahl
Polystyrol	34,6 \pm 20,1	7,6 \pm 3,2	137
Vitellinmembran Außenseite	20,5 \pm 12,9	9,9 \pm 3,3	177
Vitellinmembran Innenseite	19,7 \pm 9,5	11,2 \pm 4,3	217

Die Auswertung der Daten bestätigte die Vermutung: Die auf der VM differenzierten Zellen zeigten im Durchschnitt weniger Fettvesikel pro Zelle (20,5 \pm 12,9 VM-Außenseite und 19,7 \pm 9,5 VM-Innenseite gegenüber 34,6 \pm 20,1 bei Polystyrol). Ebenso verhielt es sich mit den Durchmessern der größten Vesikel, die im Durchschnitt bei den VM-Kulturen größer waren als bei der Kontrolle (9,9 \pm 3,3 μm VM-Außenseite und 11,2 \pm 4,3 μm VM-Innenseite gegenüber 7,6 \pm 3,2 μm bei Polystyrol). Die hohen Standardabweichungen spiegeln die Inhomogenität der Populationen an differenzierten Zellen wieder. Diese wurden alle ausgewertet. Die erfolgreiche Differenzierung zeigt nicht nur eine gute Eignung der VM als Zellkultursubstrat, sondern legt einen Effekt offen, der so nicht zu erwarten war. Es handelt sich hierbei um einen merklichen Unterschied in der zeitlichen Ausbildung der Fettvesikel.

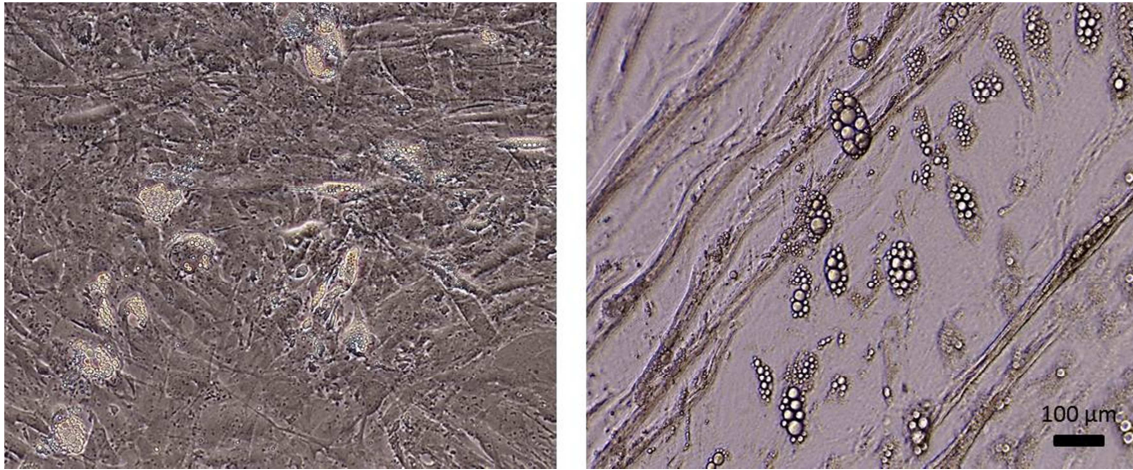


Abbildung 47: Fettvesikel in 21 Tage lang adipogen differenzierten hMSC in gleicher Vergrößerung. Links: Differenzierung in Polystyrol Zellkulturbehältern (6-Loch-Platte) zeigt viele kleine Fettvesikel pro Zelle. Rechts: Differenzierung auf der VM-Innenseite zeigt wenige große Fettvesikel und damit eine weiter vorangeschrittene Ausreifung der Adipozyten

In Zusammenhang hiermit könnte die partielle Durchlässigkeit der VM für gewisse niedermolekulare Stoffe stehen, weswegen dies untersucht wurde. Als Testsubstanz wurde zunächst eine wässrige Patentblau V-Lösung gewählt. Beim experimentellen Aufbau wurde der Dotter eines unbefruchteten Eies mit zwei Kanülen perforiert. Mit einer Spritze wurde der Dotter mit PBS ausgewaschen und anschließend mit Patentblau-V-Lösung gefüllt. Bereits nach zwei Minuten konnte der Austritt des blauen Farbstoffs durch die VM beobachtet werden (Abbildung 48, links). Dabei trat der Farbstoff über die gesamte Oberfläche der VM aus. Als weitere Testsubstanzen wurde das aus mehreren niedermolekularen Verbindungen (IBMX, Dexamethason, Indomethazin, Insulin) bestehende adipogene Differenzierungsmedium gewählt. Mit diesem Experiment sollte explizit keine Ausschlussgrenze bestimmt, sondern die Möglichkeit der Diffusion über die VM nachgewiesen werden. Der experimentelle Aufbau sollte den Übertritt dieser Substanzen über die VM durch die adipogene Differenzierung von hMSC in einem weiteren Kompartiment anzeigen (Abbildung 48, mitte).

Die hMSC wurden bis zu Konfluenz auf dem Boden einer 6-Loch-Platte kultiviert und mit 2 ml Kultivierungsmedium überschichtet. Darüber wurde ein Einsatz eingebracht, auf dessen für Flüssigkeiten durchlässigen Boden (Netz mit einer Maschenweite von 8 µm), eine VM aufgespannt wurde. Um den Austritt des vorgelegten Differenzierungsmediums (1 ml) ausschließlich über die VM zu gewährleisten, wurde

Ergebnisse

ein Silikonring aufgebracht, der den seitlichen Durchtritt der Flüssigkeit verhinderte. Das Differenzierungsmedium war entsprechend der Verdünnung der Differenzierungsfaktoren im Kulturmedium höher konzentriert (3x), um bei vollständiger Vermischung die einfache Konzentration zu erreichen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag in beiden Kompartimenten gewechselt. In drei Experimenten wurden je drei Kulturen differenziert und die Zellen nach 15 Tagen mit Oil-Red-O gefärbt. In 87,5 % der Kulturen (n=8) konnten differenzierte Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 48, rechts). Beide Experimente bestätigen die vorherige Vermutung der Durchlässigkeit der VM für niedermolekulare Stoffe.

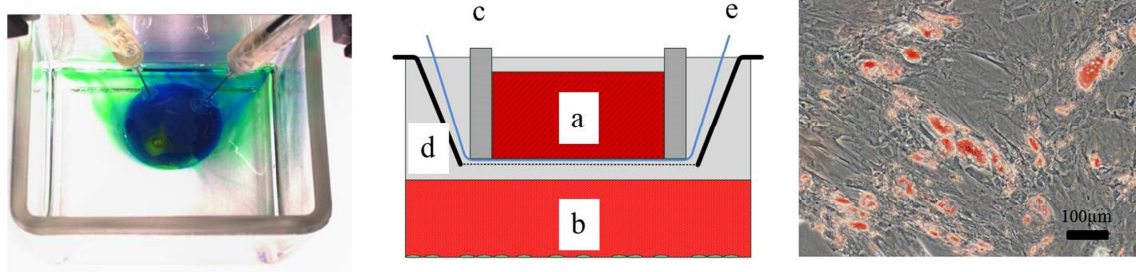


Abbildung 48: Durchlässigkeit der Vitellinmembran (VM) für niedermolekulare Stoffe. Links: Diffusion von wässriger Patentblau V-Lösung durch die VM. Mitte: Aufbau zum Nachweis der Adipogenen Differenzierung über die VM. a) 1 ml Differenzierungsmedium 3x konzentriert b) 2 ml Kulturmedium über hMSC, c) Silikonring, d) Einsatz mit Netzstruktur Maschenweite 8 µm, e) VM. Rechts: Oil Red O-Färbung adipogen differenzierter hMSC nach 15 Tagen

Das Eiklar bildet zu Beginn der Bebrütung einen großen Anteil des Bruteies. Seine Funktionalität als Kontaminationsschutz lässt auf eine Nichteignung zur Zellkultur schließen, die in einem Kultivierungsexperiment untersucht wurde. Die Kultivierung erfolgte mit L929 in vitro unter Zugabe von flüssigem Eiklar. L929 (10000 Zellen/cm²) wurden in 6-Loch-Schalen (n=6) für 24 Stunden kultiviert und anschließend pro Loch 1 ml Eiklar den 2 ml Kulturmedium zugegeben. Die Dokumentation der Zellen zeigte bereits nach 12 Stunden ein Absterben der Zellen, das nach 24 Stunden alle Zellen erfasst hatte. Der direkte Kontakt der Zellen mit dem Eiklar erwies sich als schädlich. Weitere Experimente mit Eiklar und Zellen wurden daraufhin nicht durchgeführt. Gleichwohl liefert es bei der Embryonalentwicklung die Feuchtigkeit und wird vor dem Schlupf oral aufgenommen und verstoffwechselt.

Der Dotter als Nährmedium des Embryos ist das Kompartiment, welches von der VM gegen das Eiklar abgetrennt wird. Zunächst wurde die Kultivierung von L929 *in vitro* unter Zugabe von Dotter zum Kulturmedium durchgeführt, um eine erste Einschätzung der Reaktion der Zellen auf den direkten Kontakt zu erhalten. L929 (10000 Zellen/cm²) wurden in 6-Loch-Platten (n=6) für 24 Stunden kultiviert und anschließend pro Loch 1 ml Dotter dem jeweils 2 ml Kulturmedium zugegeben (siehe Abbildung 49). Bei der Dokumentation der Zellen zeigte sich bereits nach 12 Stunden ein Absterben der Zellen. Nach 24 Stunden hatten sich alle Zellen von der Oberfläche abgelöst und waren abgestorben.

Um den direkten Kontakt von Dotter und Zellen zu vermeiden, wurde ein neues Kultivierungsprinzip entwickelt, welches unter Material und Methoden detailliert beschrieben ist. Die entwickelte Dotterkultur, welche die Kultivierung von Zellen in unmittelbarer Nähe des Dotters ohne direkten Kontakt ermöglicht, wurde in einem Kultivierungsexperiment mit L929 auf ihre Eignung zur Zellkultur evaluiert (Abbildung 49). Dabei ist herauszuheben, dass in diesem Experiment nur die Grenzfläche Dotter/Medium als Kultursubstrat diente und kein direkter Kontakt zwischen Zellen und Dotter bestand. Die L929 (5000/cm²) wurden drei Tage in Dotterkulturen kultiviert, nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumswechsel. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels L/T-Färbung untersucht. Die L/T-Färbung zeigte eine hohe Anzahl von 91,8±5,4 % FDA gefärbter Zellen.

Das Anwachsverhalten von Zellen auf dem Dotter wurde mit hMSC in der Dotterkultur durchgeführt. Auch bei diesem Experiment bestand kein direkter Kontakt der Zellen zum Dotter. Die Zahl angewachsener Zellen sollte im Vergleich zur Kontrolle (auf Polystyrol kultivierte hMSC) deutlich geringer ausfallen, so die Erwartung. Auf der Dotterkultur (n=5) und auf Polystyrol (n=6) wurden 10000 Zellen/cm² 24 Stunden lang kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DAPI gefärbt und ausgezählt. Die Anzahl der Zellen auf Polystyrol wurde auf 100,0±4,6 % normiert. Auf der Dotterkultur konnten 73,0±8,3 % der Zellen gezählt werden.

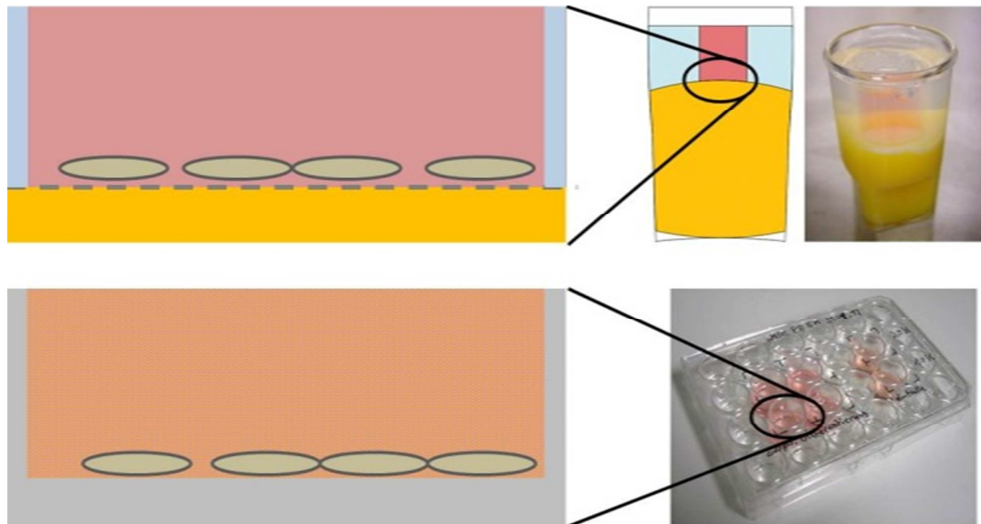


Abbildung 49: Zwei genutzte Kulturformen zur Untersuchung des Einflusses von Dotter auf Zellen (grün). Oben: Dotterkultur mit indirektem Kontakt zum Dotter. Hier waren die Zellen durch die VM (grau und gestrichelt) vom Dotter (gelb) getrennt. Abtrennung der Kulturfläche zur Seite erfolgt durch Agar (hellblau), Kultivierungsmedium (rot). Unten: Kultivierung von Zellen in Standardkulturgefäßen (grau) unter direktem Kontakt zu Dotter, der dem Kultivierungsmedium (rot) zugesetzt wurde

Auch die Passagierbarkeit sollte im Dottersystem untersucht werden, bildet sie doch einen wichtigen Schritt für die Kultivierung von Zellen. Dafür wurden hMSC auf Dotterkulturen bis kurz vor deren Konfluenz kultiviert. Nun erfolgte die Zugabe von Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) und die Messung der Zeit bis zur Ablösung gemessen. In der Kontrolle (Polystyrol) wurde eine Ablösung nach 2,5 Minuten erreicht und die Zellausbeute auf 100 % normiert. Nach 25,0 Minuten erfolgte die Ablösung der Zellen in der Dotterkultur. Beim Passagieren der Dotterkultur kam es bei 30 % der Kulturen zur Ruptur der VM (n=10). Die Passage von in der Dotterkultur kultivierten Zellen war dennoch möglich.

Der nächste Schritt der Untersuchung stellte die Kultivierung von Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen dar. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob der zellschädigende Effekt des Dotters auch über die VM hinweg wirkt. Die Langzeitkultivierung wurde mit hMSC (n=6) und L929 (n=7) durchgeführt. hMSC wurden mit 5000 Zellen/cm² und L929 mit 1000 Zellen/cm² in die Dotterkultur eingebracht. Die Kultivierung konnte mit beiden Zellsorten erfolgreich 14 Tage durchgeführt werden. Von den hMSC-Kulturen gingen bis zum Ende des Experimentes 50 %, bei den L929-Kulturen 43 % durch Auslaufen des Dotters verloren. Die

morphologische Form der L929 war in allen Kulturen normal. Bei einer Kultur der hMSC zeigten die Zellen eine deutlich länglichere Form als in den beiden verbleibenden Kulturen.

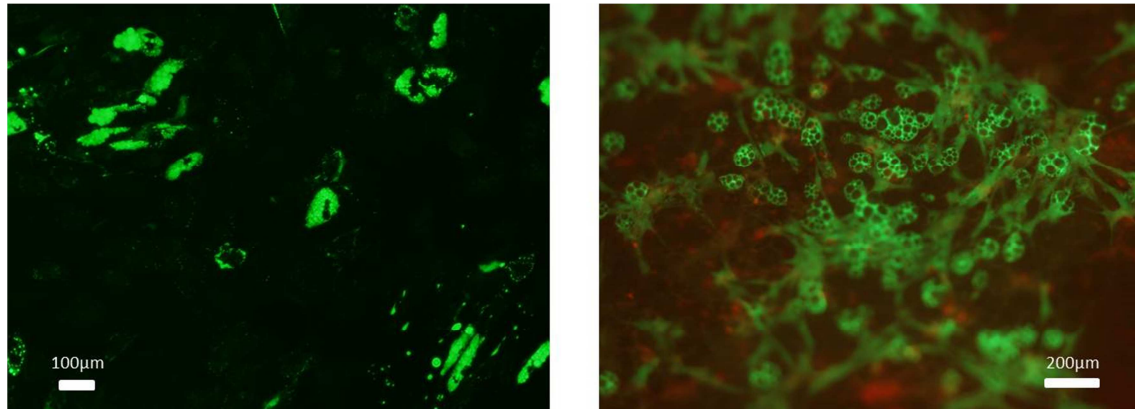


Abbildung 50: Adipogene Differenzierung von hMSC in der Dotterkultur. Links: Bodipy-Färbung der 21 Tage lang adipogen differenzierten hMSC zeigen grün gefärbte Fettvesikel. Rechts: L/T-Färbung an Tag 21 der Differenzierung zeigt über 70 % FDA (grün) gefärbte Zellen

Die adipogene Differenzierung sollte auch in der Dotterkultur durchgeführt werden, um die Eignung für komplexe biochemische Reaktionen, die hohen Anforderungen an Zellen und Kulturbedingungen stellen, nachzuweisen. 25000 Zellen/cm² wurden in Kultur genommen und mit dem Differenzierungsmedium inkubiert. Nach 21 Tagen Differenzierung konnten in einer Bodipy-Färbung der Fettvesikel eine Differenzierung in adipogene Richtung gezeigt werden (Abbildung 50). Die Bodipy-Färbung war hier der Oil-Red-O-Färbung wegen der besseren Detektierbarkeit vorzuziehen. Eine L/T-Färbung zeigte $70,1 \pm 5,5$ % grün gefärbter Zellen. Hier scheinen, trotz der erfolgreichen Differenzierung, suboptimale Kultivierungsbedingungen, die sich in der Anzahl FDA gefärbter Zellen zeigen, geherrscht zu haben.

Die Untersuchungen der VM und des Dotters auf ihre Eignung zur Kultivierung von humanen Zellen konnten unter In-vitro-Bedingungen durchgeführt werden. Bei der CAM und den anderen extraembryonalen Geweben ist dies nicht möglich. Zur Untersuchung der Zellkultureigenschaften von Amnion, Allantois und CAM muss der Hühnerembryo mitkultiviert werden, um den Verfall dieser Gewebe zu verhindern. Zu

diesem Zweck wurden die Untersuchungen der extraembryonalen Gewebe mit der Perry-Kultur durchgeführt.

Bei dem Amnion und der Allantois handelt es sich um flüssigkeitsgefüllte Blasen, die von einer dünnen Haut umgeben sind. Eine mögliche Kultivierung von Zellen ist hauptsächlich von der Biokompatibilität der beiden Flüssigkeiten in Amnion und Allantois abhängig. Zunächst wurde die Allantoisflüssigkeit in Zytotoxizitätstestes untersucht, um die Eignung für weitere Experimente beurteilen zu können. Bei der Allantoisflüssigkeit handelt es sich um eine klare Flüssigkeit mit einer Viskosität ähnlich der von Wasser. Eine gewisse Zytotoxizität ist von der Allantoisflüssigkeit zu erwarten, handelt es sich doch um das embryonale Äquivalent der Harnblase, gefüllt mit Wasser und Stoffwechselendprodukten.

Der Entnahmezeitpunkt der Flüssigkeit an Tag 6 der embryonalen Entwicklung hat sich in Vorversuchen mit unterschiedlich alten Embryonen (Tag 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13) als optimal hinsichtlich Erreichbarkeit und Ausbeute erwiesen. Die Allantoisflüssigkeit wurde den in Perry-Kulturen inkubierten Embryonen mit einer Kanüle entnommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert.

Zur Untersuchung der Bedingungen, welche in die Allantois injizierte Zellen antreffen würden, wurde eine Konzentrationsreihe der Allantoisflüssigkeit mit Zellkulturmedium hergestellt (90, 50 und 10 % Allantoisflüssigkeit) und diese in Zellkulturexperimenten untersucht. Mit diesen drei Konzentrationen sowie Kulturmedium (Kontrolle) wurden WST- und BrdU-Assay durchgeführt, um einen zellschädigenden Effekt zu erkennen. Im WST wurde die Kontrolle auf $100 \pm 16,7$ % normiert, um einen Kontrollwert für keine zytotoxischen Effekte zu generieren und mit den drei Konzentrationen verglichen. Die 90 % -Probe zeigte einen Wert von $51,7 \pm 9,7$ %, die 50 % Probe einen Wert von $75,7 \pm 13,6$ % und die 10 % Probe einen Wert von $89,1 \pm 27,5$ %. Im BrdU-Assay wurde die Kontrolle aus den gleichen Gründen wie beim WST auf $100 \pm 3,1$ % normiert und mit den Ergebnissen der Konzentrationsreihe verglichen. Die Probe mit 90 % Flüssigkeit lieferte einen Wert von $94,3 \pm 4,8$ %, die 50 % Probe einen Wert von $95,7 \pm 4,4$ % und die 10 % Probe einen Wert von $98,4 \pm 6,1$ %. Mit der 90 % Probe wurden CHO-GFP über den Zeitraum von 14 Tagen kultiviert und anschließend eine L/T-Färbung durchgeführt. Die CHO-GFP wurden wegen ihres GFP-Signals den bereits

bekannten Zellen vorgezogen und hier verwendet. Bei $65,2 \pm 3,4$ % der Zellen konnte eine grüne FDA-Färbung nachgewiesen werden.

Der nächste Schritt stellte die tatsächliche Kultivierung von Zellen unter In-vivo-Bedingungen dar. Hierzu wurde in die Allantois von 6 Tage alten Hühnerembryonen CHO-GFP-Zellen eingebracht. Je Embryo ($n=12$) wurden 30000 CHO-GFP in 1000 μ l Kulturmedium mit einer 1 ml Einmalspritze und einer 23 G Kanüle appliziert. Dokumentiert wurde das GFP-Signal der Zellen in 24 Stundenintervallen mit einem Fluoreszenzbinokular. Nach 24 Stunden waren bei 66,6 % der Kulturen die Signale noch nachweisbar. 48 Stunden nach der Applikation konnte das Signal der Zellen bei keiner Kultur mehr nachgewiesen werden. Die Embryonen wurden bis Tag 18 weiter inkubiert, die Überlebensrate bestimmt und der Embryo auf Fehlbildungen hin untersucht. 83,3 % der Embryonen überlebten bis Tag 18, wovon keiner Fehlbildungen zeigte.

Mit dem gleichen Aufbau (1 ml Spritze und 23 G Kanüle) und dem gleichen Ziel wurden ebenfalls in die Allantois sechs Tage alter Hühnerembryonen ($n=11$) CHO-GFP-Sphäroide (CHS) injiziert. Je 30 Sphäroide wurden in 300 μ l Medium injiziert. Die Dokumentation des Fluoreszenzsignals erfolgte täglich und konnte bis Tag 9 nachgewiesen werden. Die injizierten Zellen und Sphäroide konnten nach dem Verschwinden des GFP Signals nicht mehr aufgefunden werden. Am wahrscheinlichsten erscheint es, dass sie abgestorben und in der Allantois sedimentiert sind. An Tag 18 zeigten von den 81,8 % überlebenden Embryonen alle eine normale Entwicklung.

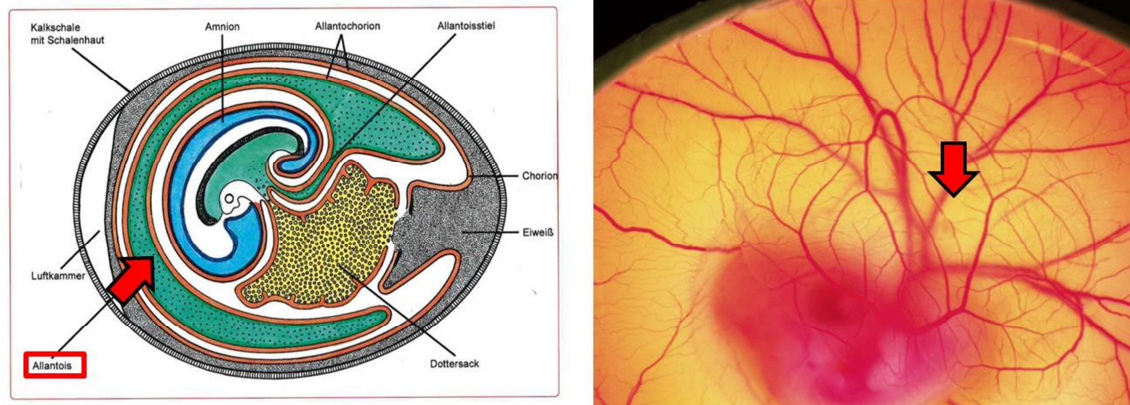


Abbildung 51: Kultivierung von Fremdzellen und Fremdgewebe in der Allantois. CHO-GFP und CHO-GFP-Sphäroiden wurden mit einer 23 G Kanüle und einer 1 ml Einmalspritze in die Allantois von 6 Tage inkubierten Embryonen eingebracht und im Fluoreszenzbinokular dokumentiert. Abbildung links abgewandelt nach Schnorr [90]

In einem weiteren In-ovo-Kultorexperiment wurden Mischsphäroide (CHO-GFP und Herzmuskelzellen = CMS) in die Allantois von sechs Tage alten Hühnerembryonen in Perry-Kultur eingebracht (Abbildung 51). Bei den CMS wurde bei jedem Sphäroid auf die durch die Herzmuskelzellen generierte Eigenkontraktion und das durch die CHO-GFP generierte GFP-Signal geachtet, sodass die Dokumentation jedes einzelnen Sphäroids möglich war. Pro Embryo (n=10) wurden 25 Sphäroide in 300 µl appliziert. Die tägliche Dokumentation des GFP-Signals konnte erfolgreich bis Tag 9 durchgeführt werden, die Dokumentation der Kontraktilität der CMS bis Tag 6. Die behandelten Embryonen, welche Tag 18 erreichten (60 %), zeigten alle eine normale Entwicklung. Die zeitlich nur begrenzte Nachweisbarkeit der Zellen und Sphäroide bestätigt die aus vorangegangenen Experimenten gewonnenen Erwartungen.

Wie mit der Allantoisflüssigkeit, so wurden auch mit der Amnionflüssigkeit Zytotoxizitätstests (WST, BrdU und L/T-Färbung) durchgeführt, um die Auswirkung des direkten Kontaktes zu Zellen abschätzen zu können. Der optimale Zeitpunkt zur Präparation der Amnionflüssigkeit wurde an unterschiedlich alten Embryonen (Tag 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13) ermittelt und mit Tag 12 gefunden. Zur Präparation der Amnionflüssigkeit wurden Bruteier für 12 Tage inkubiert und die Embryonen aus der Schale entfernt, was durch vorsichtiges und stückweises Entfernen der Schale ohne schwere Verletzung der CAM gelang. Mit einer Kanüle wurde die klare, wässrige Flüssigkeit entnommen und bis zur Testung bei -20 °C gelagert.

Mit der Amnionflüssigkeit und Zellkulturmedium wurden drei Konzentrationen (90, 50 und 10 % Amnionflüssigkeit) angesetzt und in WST und BrdU untersucht. Der zytotoxische Effekt wurde wegen der Funktion des Amnions als Umgebungsmedium des Embryos als deutlich geringer als bei der Allantois eingeschätzt. Die mitgeführte Kontrolle aus reinem Kulturmedium wurde auf $100 \pm 10,5$ % (WST) und $100 \pm 4,6$ % (BrdU) normiert, um die weiteren Ergebnisse mit dieser Negativkontrolle vergleichen zu können. Der WST-Assay lieferte für die unterschiedlichen Konzentrationen folgende Ergebnisse: 90 %-Probe: $18,7 \pm 2,5$ %, 50 %-Probe: $61,2 \pm 8,2$ % und 10 %-Probe: $87,9 \pm 13,3$ %. Der BrdU-Assay lieferte für die Konzentrationsreihe folgende Ergebnisse: 90 %-Probe: $102,4 \pm 5,3$ %, 50 %-Probe: $99,9 \pm 4,5$ % und 10 %-Probe: $95,1 \pm 6,6$ %. Die L/T-Färbung wurde nach einer 14 tägigen Kultur mit L929 durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden mit einem Medium, welches aus 90 % Amnionflüssigkeit und 10 % Kulturmedium bestand, kultiviert. $68,6 \pm 2,7$ % der Zellen zeigten die FDA-Färbung.

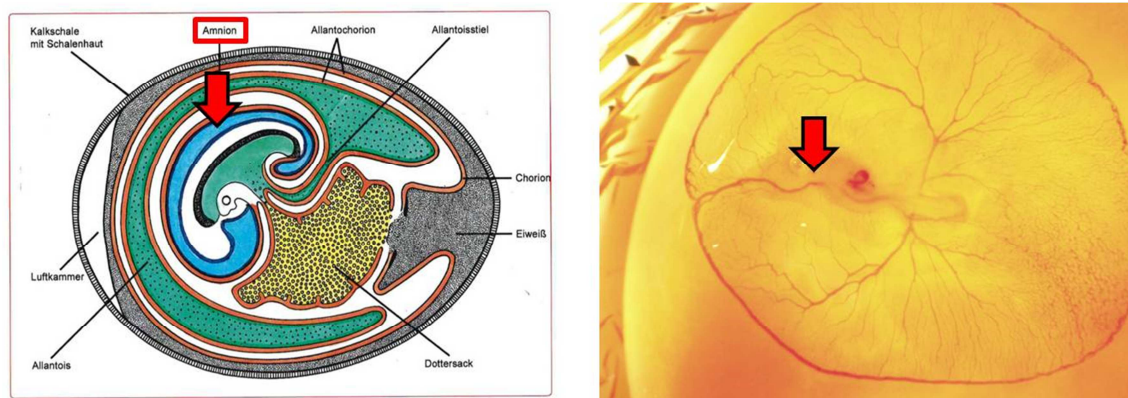


Abbildung 52: Kultivierung von Fremdzellen und Fremdgewebe im Amnion. CHO-GFP, CHO-GFP-Sphäroiden (CHS) und Mischsphäroiden (CMS) wurden mit einer 23 G Kanüle und einer 1 ml Einmalspritze in das Amnion von 3 Tage inkubierten Embryonen eingebracht und im Fluoreszenzbinokular dokumentiert. Linke Abbildung abgewandelt nach Schnorr [90]

Auch im Amnion wurden In-vivo-Experimente mit Zellen und Sphäroiden durchgeführt, um die Aussage der Zytotoxizitätstests zu festigen (Abbildung 52). Die Kultivierung der Zellen im Amnion wurde mit drei Tage alten Hühnerembryonen in Perry-Kulturen durchgeführt. Hierzu wurden bei neun Embryonen jeweils 30000 CHO-GFP Zellen in $1000 \mu\text{l}$ in das Amnion eingebracht. Es wurde eine 1 ml Einmalspritze

Ergebnisse

und eine 23 G Kanüle zur Injektion benutzt. Das Fluoreszenzsignal der Zellen wurde täglich dokumentiert. Das Signal war nach 24 Stunden nur noch bei 77,7 % der Perry-Kulturen nachweisbar. 48 Stunden nach der Injektion konnte bei keiner der Kulturen mehr ein Signal detektiert werden. Die Überlebensquote der Kulturen lag an Tag 18 bei 77,7 %. Überlebende Embryonen zeigten eine normale Entwicklung und keinerlei Hinweise auf Fehlbildungen.

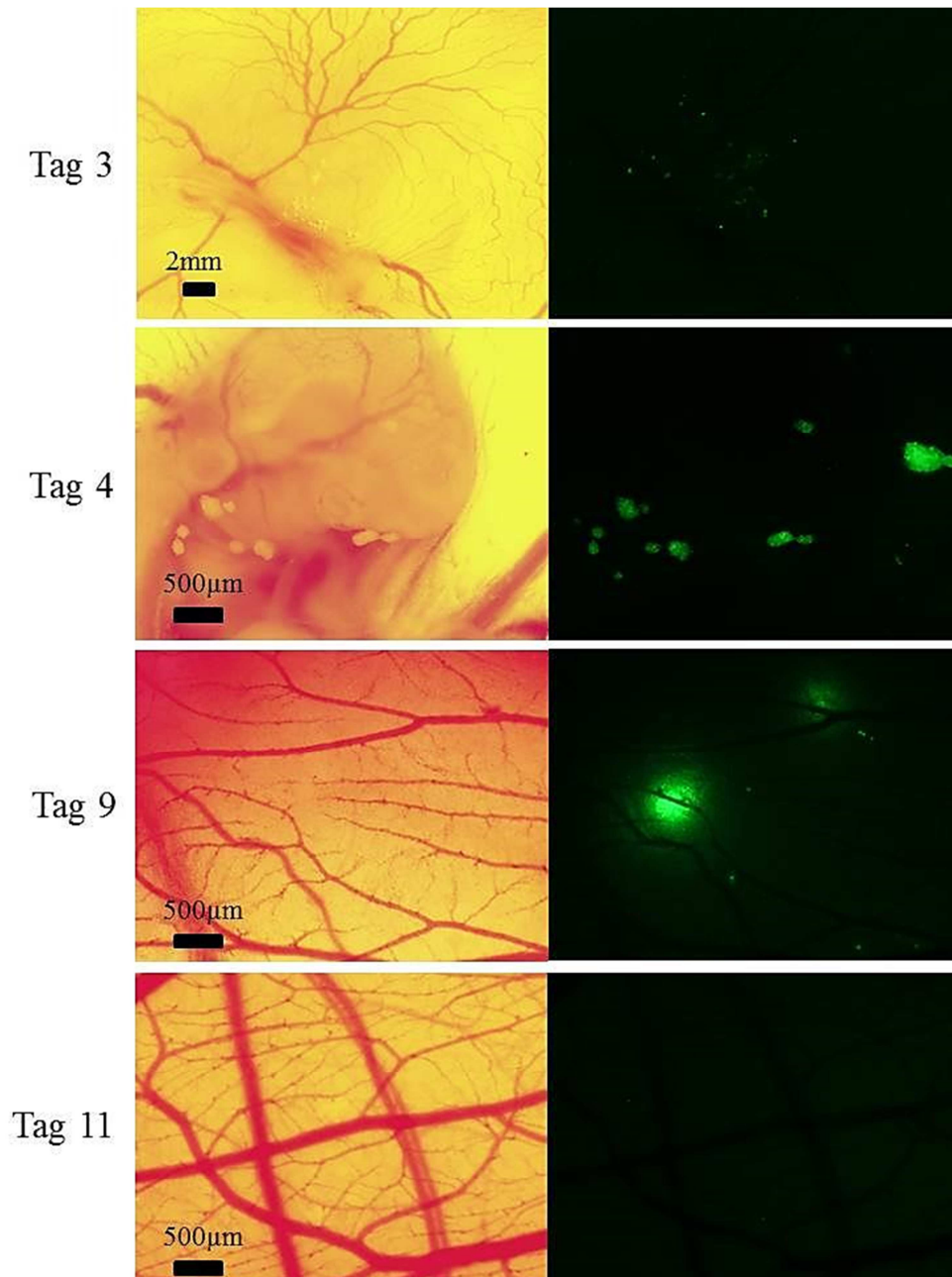


Abbildung 53: Kultivierung von CHO-Herzmuskelsphäroide (CMS) in der Amnionhöhle des Hühnerembryos. In das Amnion des 3 Tage alten Hühnerembryos wurden 25 CMS in 100 µl Medium injiziert. Dokumentation der CMS im Fluoreszenzbinokular zu verschiedenen Zeitpunkten. Die linke Spalte zeigt denselben Ausschnitt wie die rechte Spalte

Die Kultivierung von Sphäroiden wurde im Amnion mit reinen CHO-GFP-Sphäroiden (CHS) und CHO-GFP-Herzmuskelzellmischsphäroiden (CMS) durchgeführt (Abbildung 53). Je Perry-Kultur wurden 30 CHS in jeweils 100 µl Kulturmedium mit einer 100 µl Hamilton-Spritze in das Amnion gespritzt (n=11). Die Injektion der Sphäroide wurde an Tag 3 durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde wegen der ausgezeichneten und im späteren Verlauf nicht mehr auftretenden Erreichbarkeit des Amnions gewählt. Die Dokumentation des GFP-Signals konnte bis Tag 9 der Entwicklung beobachtet werden. 90,9 % der Embryonen überlebten bis Tag 18 und zeigten keine Anzeichen von Fehlbildungen.

Pro Embryo wurden 25 CMS Sphäroide in 100 µl Kulturmedium injiziert. Insgesamt wurden 11 Embryonen präpariert. Die tägliche Dokumentation konnte bis Tag 9 GFP-Signale nachweisen, die Dokumentation der Kontraktilität der CMS war bis Tag 8 möglich. Die Überlebensquote der Embryonen an Tag 18 lag bei 63,6 %. Eine nähere Untersuchung der Embryonen ergab keinerlei Fehlbildungen. Wie bereits bei den Untersuchungen der Allantois konnte nur bei den CMS eine Beeinflussung der Überlebensquote festgestellt werden. Die kurze Zeit der Nachweisbarkeit des GFP-Signals entspricht den Erwartungen und den Zytotoxizitätstests.

Die CAM bildet das äußerste extraembryonale Gewebe und ab Tag 12 der Entwicklung umschließt sie die gesamte Innenseite des Eies. Damit ist sie das am einfachsten erreichbare Kompartiment des sich entwickelnden Embryos. Durch diese exponierte Lage ist die CAM bereits seit längerem in den Fokus der wissenschaftlichen Nutzung gerückt. Die Kultivierung von Krebszellen und Krebsgewebe ist bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben worden. Heute findet sie hauptsächlich Verwendung im HET-CAM, einem Test, bei dem die Reizung von chemischen Verbindungen auf Gewebe untersucht wird. Da sich die CAM für die Untersuchung der Zytotoxizität mit WST-1-Test und BrdU-Test nicht eignet, wurde mit der In-vivo-Zellkultur zur Untersuchung begonnen.

Die Kultivierung von Einzelzellen in Zellsuspension (10000 Zellen in 200 µl) auf der CAM (Tag 10, Perry-Kultur) hat sich als ungeeignet herausgestellt. CHO-GFP konnten zwar über sechs Tage auf der CAM des 12 Tage alten Hühnerembryos dokumentiert

werden, gingen jedoch in hoher Zahl am Rand der Perry-Kultur verloren. Außerdem verteilten sich die Zellen sehr weiträumig auf der gesamten Oberfläche. Die Begrenzung der Kulturfläche erschien daher zwingend notwendig. Durch die Verwendung von Silikonringen konnte kein dichter Abschluss des Kultivierungsraumes zur CAM erreicht werden. Eine alternative Kultivierung, mit der die lokale Begrenzung der Zellen besser möglich war, wurde mit Gelatineschwämmen erreicht. Diese Schwämme wurden auf die CAM aufgebracht und mit Zellsuspension beträufelt (Abbildung 54). Für die Kultivierung wurden Embryonen genutzt, die bis Tag 12 in der Perry-Kultur inkubiert wurden (n=9). Um das Volumen von 100 µl Kulturmedium mit 130000 CHO-GFP aufzunehmen, haben sich Würfel mit einer Kantenlänge von 5 mm als geeignet erwiesen und wurden im Experiment verwendet. Die Dokumentation des GFP-Signals war bis zum Ende des Experimentes an Tag 18 möglich. Diesen Zeitpunkt erreichten 88,8 % der Embryonen. Der Gelatineschwamm unterlag in dieser Zeit einer stetigen Erosion, die sich am stärksten an den Ecken auswirkte. Durch diesen Vorgang verloren die Schwämme im Durchschnitt etwa 15 % ihrer Querschnittsfläche. Die Zellen bildeten innerhalb des Schwamms eine stabile Kultur, die auch ohne die Zugabe von weiterem Medium ein bis zum Ende des Experimentes deutliches GFP-Signal aufzeigte. Außerhalb des Schwammes konnte nur zeitweise ein Signal detektiert werden. Obwohl die CAM in der Nähe der Schwämme ein dichteres Adernetzwerk bildete, konnte kein Einwachsen der Blutgefäße in die Schwämme beobachtet werden. Bemerkenswert ist, dass die Kultivierung ohne die weitere Zugabe von Kulturmedium gelang.

Auch die Kultivierung von Sphäroiden auf der CAM wurde im Rahmen der Aufgabenstellung dieser Arbeit als wichtiges Experiment erachtet, da sie die Grundlage für einen Anschluss an das Gefäßsystem darstellt. Sie wurde mit CHS (Tag 10, Perry-Kulturen) durchgeführt. Die verwendeten Sphäroide hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 120 µm. Pro Embryo (n=9) wurden 30 Sphäroide in 300 µl Kulturmedium aufgebracht. Gegen ein Verrutschen der Sphäroide wurde ein 1 cm durchmessender Silikonring verwendet. In einem Vorexperiment konnte die Retention von Sphäroiden erfolgreich gezeigt werden. Die Dokumentation des Fluoreszenzsignals erfolgte täglich und zeigte bis Tag 18 ein deutliches Signal. Die Sphäroide wuchsen pro Tag durchschnittlich 14 µm im Durchmesser bis sie an Tag 18 einen durchschnittlichen

Durchmesser von 230 μm aufwiesen. 100 % der Embryonen überlebten bis Tag 18 und zeigten eine normale Entwicklung und keine Missbildungen.

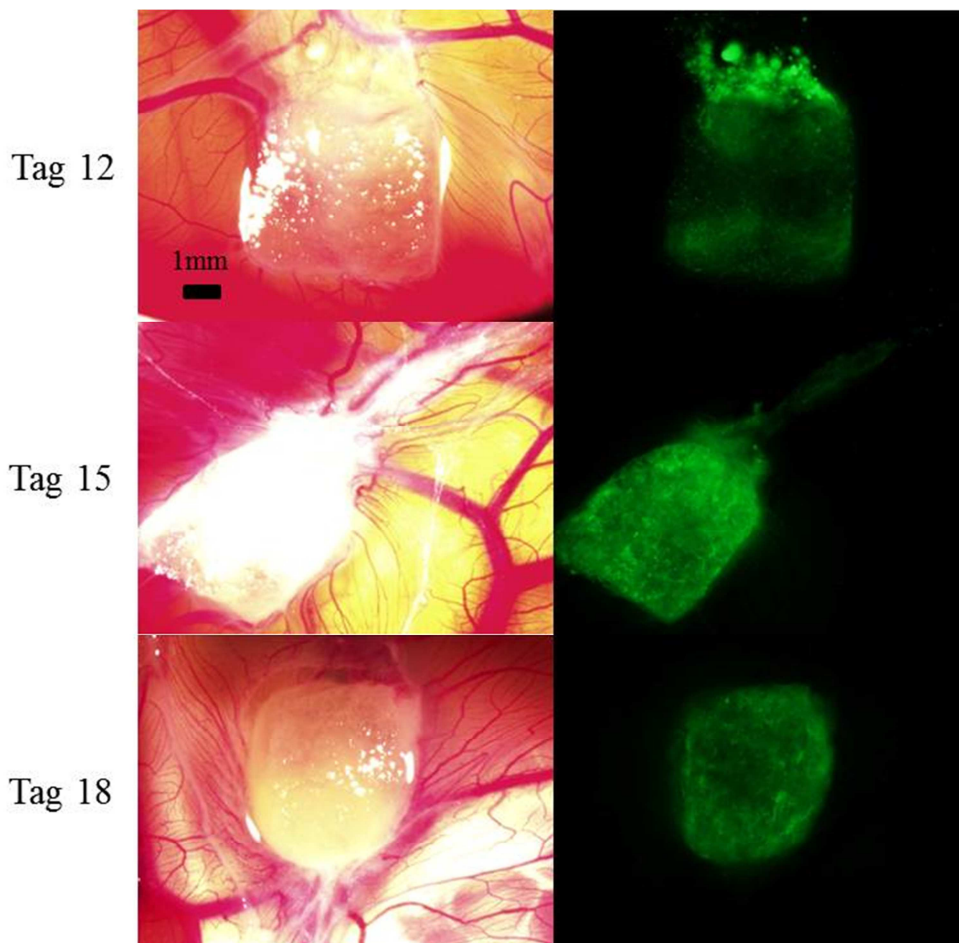


Abbildung 54: Kultivierung von Zellen (CHO-GFP) in Gelatineschwämmen auf der CAM ab Tag 10 der Bebrütung. Dokumentation der Zellen im Fluoreszenzbinokular zu verschiedenen Zeitpunkten. Die linke Spalte zeigt denselben Ausschnitt wie die rechte Spalte

3.2.2 Retardierung der Entwicklung des Embryos

Das Wachstum von Geweben ebenso wie die Differenzierung von Stammzellen ist in vivo mit mehreren Wochen zu veranschlagen. Daher ist der Faktor Zeit für die Nutzung des Hühnerembryos im Tissue Engineering ein wichtiger Aspekt. Die Entwicklungsdauer des Hühnerembryos von 21 Tagen stellt eine Limitierung dar, falls sich die Co-Kultur des Embryos mit Säugerzellen als erforderlich erweist. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit Eier einer anderen Spezies (z.B. Gans oder Strauß), die eine längere Brutdauer aufweisen zu nutzen. Besser wäre es jedoch, den

Ergebnisse

Modellorganismus so zu manipulieren, dass eine längere Nutzungsdauer möglich ist. Hier bietet sich eine Retardierung der embryonalen Entwicklung an. Es stellt sich die Frage, ob eine Verzögerung der Entwicklung möglich ist und wenn ja, für welche Zeitspanne. Ein Parameter über den dies möglich erscheint, ist die Bruttemperatur, da verzögerte Entwicklungen als Brutfehler oft mit zu geringer Inkubationstemperatur in Zusammenhang gebracht werden.

Im Experiment wurde der Einfluss einer abgesenkten Inkubationstemperatur auf das Vorschreiten der Entwicklung untersucht. Dazu wurden Bruteier für 18 Tage bei verschiedenen Temperaturen (37,5; 37,0; 36,0; 35,0 °C) inkubiert und geöffnet (Abbildung 55, rechts). Die Embryonen wurden getötet und ihre Entwicklungsstufe nach HH bestimmt [45]. Die Einstufung der Entwicklung erfolgte über die Länge des längsten Zehs und die Länge des Schnabels (Abbildung 55, links). Um rassebedingte Differenzen zur Literatur zu berücksichtigen, wurde das Experiment auch bei 37,5 °C durchgeführt, um einen Kontrollwert zu generieren. Neben der Einstufung der Embryonen wurde die Überlebensquote bestimmt, da zu erwarten war, dass diese durch die abgesenkten Inkubationstemperaturen ebenfalls abgesenkt würden. Jede Temperatur wurde in drei unabhängigen Experimenten getestet und die Ergebnisse zusammengefasst.

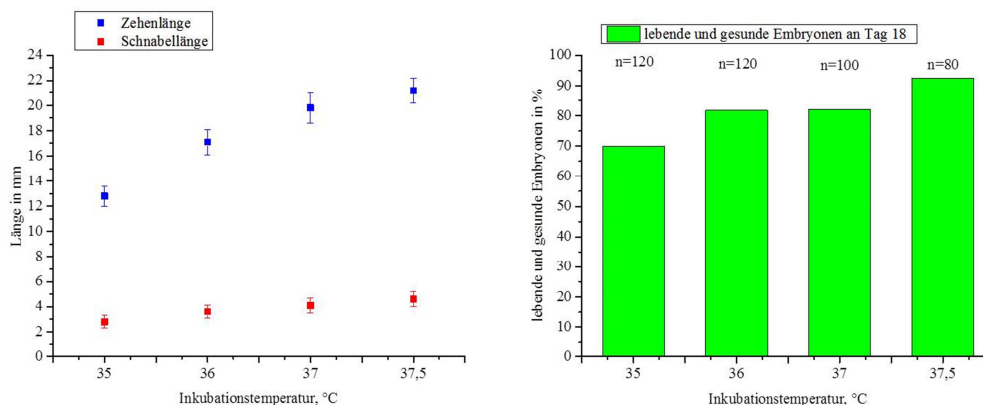


Abbildung 55: Schnabellänge, Zehenlänge und Überlebensrate von Embryonen an Tag 18 bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen. Links: Aufgetragen ist die durchschnittliche Zehen- und Schnabellänge an Tag 18 gegen die Inkubationstemperatur. Rechts: Die durchschnittliche Überlebensquote an Tag 18 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Die Kontrolle (37,5 °C) zeigte eine Überlebensquote (Tag 18) von 92,5 %. Parallel mit dem Absenken der Inkubationstemperatur konnte erwartungsgemäß eine Abnahme der Überlebensquote auf 82 % bei 37,0 °C, 81,7 % bei 36,0 °C und 70,0 % bei 35,0 °C festgestellt werden. Die Zehen- als auch die Schnabellänge zeigten ebenfalls einen eindeutigen Trend hin zu kleineren Längen bei niederen Temperaturen. Im Vergleich zu den Literaturwerten [45] stimmten die Werte der Kontrolle bei der Zehenlänge überein. Die Werte der Schnabellänge in der Literatur waren durchweg um 1 mm länger als die hier gemessenen. Diese Differenz ist vermutlich Rasse bedingt und wurde bei der Ermittlung der Entwicklungsstufe berücksichtigt. Die Embryonen wurden im Durchschnitt wie folgt eingestuft: 37,5 °C Hamburger Hamilton Stage (HH) 44 (=Tag 18), 37,0 °C entspricht HH 43 (=Tag 17), 36,0 °C entspricht HH 42 (=Tag 16), und 35,0 °C entspricht HH 40 (=Tag 14). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Embryonen bei geringeren Inkubationstemperaturen weniger vital wirkten als bei höheren Temperaturen. Bei 35,0 °C zeigten die Embryonen kaum eigene Bewegungen wie sie die Kontrolltiere normalerweise zeigen und wirkten lethargisch. Diese Beobachtung trat in schwächerer Ausprägung bei der bei 36,0 °C inkubierten Gruppe auf.

In einem weiteren Experiment wurden Bruteier bei 35,0 °C bebrütet und zum Schlupf gebracht. Ziel war es zu überprüfen, ob und wenn ja wann ein Schlupf bei 35,0 °C möglich ist und ob damit eine verlängerte Nutzung für Kulturexperimente besteht. Die Bruteier wurden nach Standardprotokoll inkubiert. An Tag 24 der Bebrütung zeigte eines der Eier (n=3) erste Brüche in der Schale. Durch Schieren konnten in allen Bruteiern zu diesem Zeitpunkt lebende Embryonen nachgewiesen werden. Keines der Küken konnte allein den Schlupfprozess erfolgreich beenden. An Tag 25 wurden die Eier geöffnet und die gestorbenen Embryonen untersucht. Die Vermessung von Schnabel und Zehen erlaubte auch hier eine Zuordnung der Entwicklungsstufe. Äußerlich wiesen die Embryonen keine Missbildungen auf. Die verstorbenen Embryonen entsprachen ihrer Entwicklung nach HH45 (=Tag 19-20). Dies entspricht einer Verzögerung der Entwicklung des Hühnerembryos um 4-5 Tage, die durch die Herabsetzung der Inkubationstemperatur erreicht werden konnte.

3.2.3 Anschluss von Fremdgewebe an das Gefäßsystem des Embryos

Der Anschluss eines funktionalen Gewebes an das Blutgefäßsystem des Embryos stellt für die Arbeitshypothese dieser Arbeit eines der Schlüsselexperimente dar. Durch den Anschluss eines Gewebes an das Versorgungssystem des Embryos könnte ein Wachstum des Gewebes über die diffusionsbegrenzte Größe hinaus erreicht werden, was im Tissue Engineering bisher nicht möglich war. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde nach einem funktionalen, nicht tumoralen Mikrogewebe gesucht, mit dem der experimentelle Anschluss an das Blutgefäßsystem des Hühnerembryos untersucht werden sollte. Hierfür boten sich Herzmuskelsphäroide des embryonalen Hühnerherzens (HMS) an, die eine sehr einfache mit dem Auge wahrnehmbare Eigenkontraktion aufweisen. In den Experimenten verwendete HMS hatten einen Durchmesser von 110 μm und eine deutliche Eigenkontraktion. Sphäroide ohne Eigenkontraktion wurden ausgesondert und nicht verwendet. Als Kultursubstrat eignet sich nach den Erkenntnissen aus den bisherigen Experimenten die CAM, ab Tag 10 der Entwicklung in der Perry-Kultur, am besten.

Für die Kultivierung der HMS auf der CAM wurden Silikonringe genutzt, um ein Verschwinden der Sphäroide zwischen Schale und CAM zu verhindern. Das Aufbringen der HMS wurde so schnell wie möglich und bei jeder Kultur einzeln durchgeführt, da sich zeigte, dass die HMS bei Temperaturabnahme schnell ihre Kontraktilität verloren. Im ersten Versuch sollte die Kultivierung ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren durchgeführt werden. Um eine Aussage über den Zustand des Embryos sowie der HMS treffen zu können, musste eine regelmäßige Beobachtung erfolgen. Diese wurde täglich durchgeführt, um das Absterben der Embryonen oder eine Veränderung der Sphäroide wahrnehmen zu können. Eine farbliche Veränderung der Sphäroide vom weißen Ausgangszustand ins Rote wäre ein Hinweis auf einen erfolgten Anschluss an das Gefäßsystem des Embryos und die Durchblutung. In mehreren Experimenten ($n=4$) wurden HMS ($15/\text{cm}^2$ Kulturfläche), HMS-Medium und PBS auf der CAM von zehn Tage alten Hühnerembryonen kultiviert. Als Kulturform für die Hühnerembryonen wurde die bereits bewährte Perry-Kultur gewählt. Die Ergebnisse der vier Experimente wurden zur Auswertung zusammengefasst.

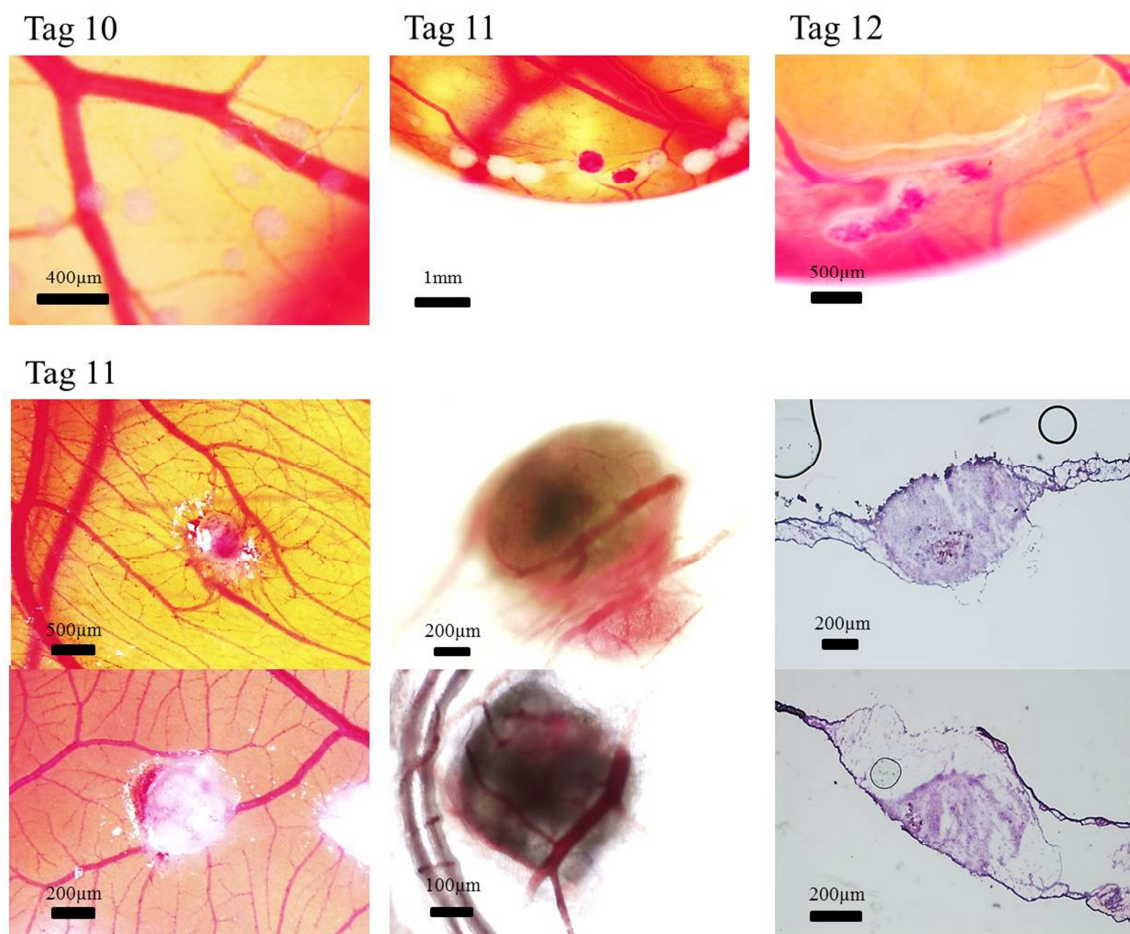


Abbildung 56: Kultivierung von Herzmuskelsphäroiden (HMS) auf der CAM ab Tag 10 der Bebrütung. Oben: Verhalten der HMS zur verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung des Hühnerembryos. Unten: Vaskularisierte HMS an Tag 11, 24 Stunden nach Aufbringen (Links), an Tag 11 aus der CAM entnommen und unter dem Mikroskop dokumentiert (Mitte) und H/E gefärbte Kryoschnitt, 10 µm dick (Rechts)

Die PBS- (n=16) und HMS-Medium (n=18) Kontrollen zeigten keine Reaktionen über den gesamten Zeitraum des Experimentes (Tag 10-18) und wiesen eine Überlebensrate an Tag 18 von 87,5 % (PBS) und 83,3 % (HMS-Medium) auf. Bei den HMS (n=35) zeigte sich nach 24 Stunden bei 20 % der Perry-Kulturen eine sichtbare Veränderung der HMS (Abbildung 56). Einzelne Sphäroide zeigten rote Verfärbungen und das Einwachsen feinsten Gefäße. Dabei konnte bei 80 % dieser Sphäroide noch immer die Kontraktilität festgestellt werden. Bei einigen Exemplaren konnte sogar ein rhythmisches Erscheinen und Verschwinden der roten Verfärbung beobachtet werden. 71,5 % der HMS-Kulturen mit diesen Veränderungen starben in einem Zeitraum von 48 Stunden nach Auftreten der Veränderung. Die restlichen 28,5 % verendeten in den darauf folgenden 24 Stunden. Kein Embryo mit den beobachteten Veränderungen

Ergebnisse

(Rotfärbung) der HMS erreichte Tag 15. Die Kulturen, die keine rot gefärbten HMS aufwiesen (n=28), zeigten eine Überlebensrate von 57,1 % an Tag 18.

Einige Proben wurden 24 Stunden nach Erscheinen der Rotfärbung aus der CAM entfernt und unter dem Mikroskop dokumentiert. Hier konnte eine erhöhte Dichte von Blutgefäßen in der CAM um die Sphäroide und deren Einwachsen in die Sphäroiden bestätigt werden. Aus den Proben wurden Kryoschnitte von 10 µm Dicke angefertigt und mit H/E gefärbt. In den gefärbten Schnitten konnten Blutgefäße auf der Oberfläche, aber auch im Innern der Sphäroide gefunden werden. Besonders bemerkenswert hieran ist die Tatsache, dass die Veränderung der Gefäßstruktur ohne extern zugesetzte Wachstumsfaktoren stattgefunden hat.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Problem der Verfügbarkeit von Ersatzorganen und Geweben zur Substitution von beschädigten oder verlorenen Strukturen erläutert. Die bekannten Ansätze, neben der Nutzung von Allotransplantaten, wurden beschrieben und auf ihre Erfolgsaussichten hin bewertet [28, 25, 22, 68, 42, 9, 21, 80, 16, 71]. Es wurde festgestellt, dass bereits erste wichtige Erfolge auf diesem Gebiet gemacht wurden, man aber bisher bei der Generierung von dreidimensionalen Geweben keinen nennenswerten Fortschritt erzielt hat. Die Hypothese, dass dies auf die Versorgung der künstlich generierten Gewebe über freie Diffusion von Nährstoffen zurückzuführen ist, wurde aufgestellt. Eine Möglichkeit, diese Limitation zu überwinden, wurde entwickelt und untersucht. Das Modell des Hühnereies sollte genutzt werden, um diese Grenze des Tissue Engineerings zu überwinden. Daher stellten sich folgende Fragen:

Sind die neu entwickelte In-ovo-Kulturform und Inkubatoren für die systematische Untersuchung von Zell- und Gewebekultur im Modellsystem Hühnerei geeignet?

Bereits seit der Antike wird die Embryonalentwicklung des Huhns als Modellsystem für wissenschaftliche Zwecke verwendet [10]. Wegen seiner exponierten Entwicklung außerhalb des Muttertieres und weiterer Eigenschaften erschien es als geeignetes Modellsystem für die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation. Der erste Schritt stellte die Etablierung eines Inkubationssystems und einer geeigneten Kultivierungsform dar. Die kommerziell erhältlichen Inkubatoren zur Bebrütung von Hühnerembryonen (Abbildung 57, links) beschränken sich im Wesentlichen darauf, die klimatischen Grundvoraussetzungen für die Bebrütung bereitzustellen. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Inkubationssysteme für die speziellen Bedürfnisse der wissenschaftlichen Forschung, wie eine automatisierte Dokumentation, bekannt. Erst gegen Ende der Arbeiten konnte mit dem Arguscope[®] [4] ein solcher Inkubator ausfindig gemacht werden (Abbildung 57, rechts). Hierbei handelt es sich um ein

Diskussion

Inkubationssystem mit Dokumentationsmöglichkeit. Das Arguscope[®] ähnelt in seinen Funktionen dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, aufgebauten und evaluierten Inkubator für mehrere In-ovo-Kulturen. Allerdings ist der neu aufgebaute Inkubator den kommerziell verfügbaren deutlich überlegen. Im Gegensatz zum Arguscope[®] bietet er mehr Platz (24 statt 9 Kulturen) und erlaubt neben den geöffneten Bruteiern nach Kunzi-Rapp [54] auch die Verwendung von anderen Kulturformen wie der ebenfalls neu entwickelten optimierten Perry-Kultur mit Deckelsystem. Eine hohe Varianz an Experimenten wie Begasungen mit unterschiedlichen Atmosphären (z.B. Hypoxie und Hyperoxie) sind ohne Änderungen durchführbar.



Abbildung 57: Kommerziell verfügbare Inkubatoren. Links: Standardmotorbrüter Top Profi 300 der Firma J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co. KG. Diese Inkubatoren ermöglichen die Inkubation einer großen Menge von Eiern, bieten allerdings keine Möglichkeit der Dokumentation. Rechts: Arguscope[®][4], der einzige, erst zum Ende dieser Arbeit verfügbare Inkubator, mit automatisierter Dokumentationsmöglichkeit.

Für den Inkubator der In-ovo-Kultur ist kein vergleichbares Produkt auf dem Markt bekannt. Hier wurde der Fokus auf eine kompakte Bauart, die hochauflösende Doku-

mentation und die Fähigkeit zur Manipulation gelegt. Da kein vergleichbares Konzept bekannt ist, musste bei der Entwicklung Neuland betreten werden. Dieses neue und hochkomplexe System wurde erfolgreich aufgebaut und evaluiert. Zusammen mit der optimierten Perry-Kultur konnte so die Grundlage für die weiteren Untersuchungen gelegt werden.



Abbildung 58: Augendefekte bei Hühnerembryonen. Augendefekte, die nach dem Auftragen verschiedener Klebstoffe auf die Schale von Bruteiern auftraten, weisen auf eine negative Beeinflussung der embryonalen Entwicklung durch die chemischen Bestandteile des Klebstoffs hin.

Die Entwicklung der Deckelkonstruktionen mit ihren Antikondensationssystemen stellt eine nicht unwesentliche Modifikation der Perry-Kultur dar, die für eine qualitativ hochwertige Dokumentation und Manipulation zwingend notwendig erschien. Die Anbringung des Kleberinges an der Eischale war, wie die Experimente zeigten, ein besonders heikler Schritt. In mehreren Publikationen ist die Schädigung des Hühnerembryos durch die Einwirkung von Chemikalien beschrieben. So traten insbesondere Augendefekte und Fehlbildungen auf [1, 53]. Unter der Betrachtung der kombinierten Kriterien von Schlupfrate, Handhabung, Härte­dauer, Klebekraft und Missbildungsquote hat sich der für die Verklebung von Operationswunden zugelassene Gewebeklebstoff Histoacryl® als optimal geeignet für die Verwendung nahe dem Embryo gezeigt. Das Auftreten der Missbildungen (Abbildung 58) lässt sich mit der Härte­dauer erklären. Durch die

schnelle Aushärtung verliert ein Klebstoff schnell seine chemische Reaktivität und ist in der ausgehärteten Form reaktionsträge und unschädlich. Je schneller die Aushärtung verläuft, desto weniger Zeit verbleibt für die Schädigung des Embryos. Gerade in diesem Experiment lässt sich die Eignung für ein Testverfahren zur Beurteilung der teratogenen Wirkung von chemischen Stoffen und Gemischen erkennen. Wie gezeigt, bedarf es hierbei nicht des direkten Kontaktes der Testsubstanz mit dem Embryo, sondern das Auftragen auf die Schale genügt. Diese Methode würde einen Kostenvorteil gegenüber etablierten Teratogenitätstests mit Ratte, Maus und Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) bringen, da die kostenintensive Tierhaltung entfallen würde [92].

Die Auswirkung von dauerhafter Beleuchtung und Intervallbeleuchtung, wie sie zur automatisierten Dokumentation in den neuen Inkubatoren nötig ist, wurde von Tamimie an geschlossenen Bruteiern untersucht [99]. Dabei wurde festgestellt, dass beide Beleuchtungsarten die Überlebensquote senken, also schädlich auf die Entwicklung wirken. Hierbei fällt die Wirkung der Dauerbeleuchtung stärker als die der gepulsten Beleuchtung ins Gewicht. Diese Beobachtungen konnten in der Perry-Kultur bestätigt werden. Auch hier zeigte eine Dauerbeleuchtung eine starke Reduktion der Überlebensquote von 87,5 bzw. 77,7 % auf jeweils 50,0 %. Mit der Beleuchtung im 20-Minutenintervall scheint ein Schwellwert überschritten worden zu sein, bei dem keine Absenkung der Quote und damit Schädigung des Embryos erfolgt. Die Beleuchtung kann über die früh entwickelten Augen einen Reiz auslösen, welcher an der selbstständigen Bewegung des Embryos erkennbar ist. Wird dieser Reiz zum Dauerreiz, ist es wahrscheinlich, dass Stressreaktionen auftreten, welche das Absenken der Überlebensquote begründen.

Die Notwendigkeit des Wendens der In-ovo-Kulturen für eine möglichst hohe Überlebensquote wurde oft beschrieben [37, 85, 78]. Ohne Wendungen werden verschiedene abnormale Entwicklungen, wie die Änderung der physikalischen Eigenschaften der Amnion- und Allantoisflüssigkeit [85] oder das Verkleben des Embryos mit der Schalenmembranen [37] beschrieben. New beschreibt die Funktion des Wendens darin, das Anwachsen des Chorions an die Schalenhäute vor Tag 7 zu verhindern. Dies erschwere die Bildung der Flüssigkeit unter dem Blastoderm. Außerdem soll dadurch die Nutzung

des im Eiklar gespeicherten Wassers beeinflusst werden, was sich negativ auf die Überlebensrate auswirkt. Diese Einschätzungen stützen die Ergebnisse mit der Perry-Kultur. Eine Verminderung der Überlebensquote um 50 % deckt sich mit den Ergebnissen der angegebenen Quellen. Zu den Auswirkungen einer erhöhten Wendegeschwindigkeit auf die Entwicklung des Hühnerembryos konnte keine Literatur gefunden werden. Vermutlich bestand bisher kein Bedarf einer schnellen Wendung. Die beobachtete schädigende Wirkung von schnellen Wendebewegungen lässt sich vermutlich auf die Beschädigung der an die Schalenhäute anwachsenden CAM zurückführen. In eigenen Experimenten konnte die Ablösung der CAM von den Schalenhäuten noch bis Tag 12 relativ einfach erfolgen, wobei kleinere Blutungen auftraten. Bei ruckartigen Bewegungen können hierbei auch große Gefäße reißen, was starke Blutungen verursacht. Neben den Gefäßen der CAM wäre auch eine Schädigung feiner embryonaler Gewebe eine Erklärung für das Absinken der Überlebensquote.

Die Feststellung, dass der Vogelembryo von der Bewegung des Eies während der Embryogenese profitiert, könnte auch für das Tissue Engineering interessant sein. Eine mechanische Beanspruchung von sich entwickelnden Geweben findet sich bei fast allen Embryonalentwicklungen. Es ist möglich, dass zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung von Organen und Geweben ein mechanischer Reiz nicht nur förderlich, sondern auch notwendig ist. Wird der Mechanismus dieses Effektes, verstanden und auf die In-vitro-Kultur angewendet, könnte dies dem Tissue Engineering weitere wichtige Impulse geben.

Die Funktionalität des neuen Deckelsystems, insbesondere der Antikondensationsmechanismen, stellt die Grundlage für die Dokumentation sicher. Mit einer minimal notwendigen Temperatur von 36,5 °C wurde die Kondensationsfreiheit dauerhaft erhalten und kein Anzeichen für eine Schädigung der embryonalen Entwicklung erkannt. Ein großer Vorteil gegenüber der Perry-Kultur und anderen gängigen Kultivierungsmethoden für Hühnerembryonen bietet die Manipulation ohne Öffnung des Systems. Mit dem Manipulationsdeckel ist dies möglich. Somit entfällt einerseits die manipulationsbedingte Pause in der Dokumentation und andererseits sinkt die Gefahr einer Kontamination der Kultur. Wie bereits mehrmals erwähnt, ist der Schlupf von gesunden Küken als

Nachweis für die Eignung von Kulturgefäßen und Inkubationsparametern anzusehen. Dieser Standard konnte mit dem Deckelsystem und dem Inkubator für eine In-ovo-Kultur in allen Kombinationen (Deckel- und Antikondensationssystem) erreicht werden. Mit der erfolgreichen Durchführung des Schlupfexperimentes und der erfolgreichen Nutzung der automatisierten Dokumentation kann der Inkubator als evaluiert angesehen werden.

Die Tatsache, dass kein vergleichbares System bekannt ist, macht den Inkubator für eine In-ovo-Kultur einzigartig. Er erfüllt alle gestellten Anforderungen und erweitert das Portfolio an Inkubationssystemen für Hühnereier um ein vielseitiges und flexibles Werkzeug. Die Aufzeichnung der Inkubationsparameter sowie die automatisierte Dokumentation erhöhen den Wert des Inkubators für standardisierte Anwendungsprotokolle. Ein Beispiel hierfür wäre ein automatisierter HET-CAM. Neben der Verwendung für Hühnereier ist mit minimalen Änderungen auch die Brut anderer Eier z.B. Wachtel- oder Enteneiern, ja sogar Reptilieneiern möglich. Ebenso ist kein großer Aufwand nötig, den Inkubator für Begasungsexperimente umzubauen. Eine Begasung mit CO₂ stellt in der Konstruktion keine große Herausforderung dar und würde somit die grundlegende Fähigkeit zur klassischen In-vitro-Zellkultur von Zellen herstellen [89, 61]. Die Wendemechanik würde den Inkubator neben der Kultivierung adhärenter Zellen auch zur Generierung von Sphäroiden befähigen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und evaluierten Inkubatoren sowie das In-ovo-Kultursystem mit Deckel erscheinen für die systematische Untersuchung von Zell- und Gewebekulturen gut geeignet und ermöglichen Experimente mit dem Modell Hühnerei auf einem neuen Niveau.

Wie gut ist das vollständig künstliche Kultivierungssystem für Untersuchungen des sich entwickelnden Hühnerembryos im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen vollständig künstlichen Kultivierungssystemen geeignet?

Die verschieden lange Kultivierung von Vogelembryonen in vollständig künstlichen Kultivierungssystemen wurde bereits mehrfach beschrieben [5, 33, 51, 52, 55]. Als Motivation hierfür wird der Schutz vom Aussterben bedrohter Arten oder die Verwendung als biologisches Lab-on-a-chip-System aufgeführt. Für den in dieser Arbeit gewählten Ansatz, das Ei als Kultivierungsumgebung für biologisches Material zu nutzen, findet sich keine Beschreibung. Aktuell existiert für das Huhn kein Kultivierungssystem, das wie die Perry-Kultur, die gesamte Entwicklung in vollständig künstlicher Umgebung ermöglicht [82]. Solche Systeme würden, im Falle einer Nutzung des Hühnerembryos im Tissue Engineering, eine definierte Umgebung mit besseren Kontrollmöglichkeiten, verglichen mit der natürlichen Eierschale, darstellen.

Auerbach etablierte ein auf Kunststoffpetrischalen beruhendes System, mit dem er eine Kultivierung von Tag 3 bis maximal Tag 18 beschreibt [5]. Allerdings erreichen nur 30 % der Embryonen den Entwicklungstag 12 und ein minimaler Bruchteil den maximal angegebenen Zeitpunkt von Tag 18. In eigenen Experimenten mit diesem System konnte nur eine maximale Entwicklung von 14 Tagen erreicht werden. Das von Dunn beschriebene Kultivierungssystem nutzt eine in einem Gestell aufgespannte Frischhaltefolie als Kultivierungsgefäß [33]. Die mögliche Kultivierung der Embryonen ist bis Tag 21 beschrieben. Die einzige bekannte Publikation, die behauptet, Vogelembryonen in einem vollständig künstlichen System zum Schlupf gebracht zu haben, stammt von Kamihira [51]. Sie beschreibt ein System, in welchem Wachtelembryonen in einer Teflonmembran mit Kalziumzugabe und Sauerstoffbegasung zum Schlupf gebracht wurden. Haque konnte diese Ergebnisse nicht reproduzieren [46]. Andere Quellen, denen dies gelungen ist, sind nicht bekannt. Das von Kawashima beschriebene System besteht aus einem halbrunden Kunststoffgefäß, das mit einer Folie abgedeckt wird [52]. Die Kultivierung von Hühnerembryonen in diesem System wurde ausschließlich für die frühe Phase der Entwicklung (Tag 1-6) beschrieben. Das Kultivierungssystem von Lai nutzt aus PDMS hergestellten Abgüssen von Hühnereiern, deren Wandstärke bei 1-1,2

cm liegt [55]. Eine maximale Kultivierung der Hühnerembryonen ist mit Tag 17 beschrieben.

Bei der Eierschale, die das Inkubationsgefäß der Natur darstellt, handelt es sich, entgegen der oft oberflächlichen Betrachtung, um eine hochkomplexe und in ihren Eigenschaften wohl definierte Struktur. Bei der Substitution dieser Struktur galt es, um die vollständige Entwicklung zu ermöglichen, mehrere Funktionen der Eierschale zu berücksichtigen. Die zuerst genannte ist die Versorgung mit Kalzium. Im frisch geschlüpften Küken sind durchschnittlich 26 g Kalzium vorhanden, in Dotter und Eiklar eines Bruteies hingegen nur 6,4 mg [35]. Die Versorgung mit Kalzium für den Aufbau von Knochen ist eine wichtige Funktion der Schale, vor allem im späten Entwicklungsstadium des Embryos [34, 79]. Die Versorgung des sich entwickelnden Embryos mit Kalzium aus dem Schalenmaterial stellt eine Limitierung in der Auswahl des Materials für eine künstliche Schale dar. Diese Limitierung wurde erfolgreich durch die Zugabe einer alternativen Kalziumquelle aufgehoben. Die Zuführung von Kalzium über gemahlene Schalenpulver wurde von Schomann beschrieben [91] und die Verwendung von Kalzi-umlaktat fand bei der Kultivierung von Wachteln im Kamihira-System Anwendung [51].

Der Grund, warum ein Schlupf aus einem vollständig künstlichen System in dieser Arbeit nicht gelang, ist wahrscheinlich nicht auf eine Ursache zurückzuführen, sondern vielschichtig. Einen negativen Einfluss der Kalziumzugabe konnte erwartungsgemäß im Experiment ausgeschlossen werden. Obgleich dies kein Beweis dafür ist, dass Kalziummangel ein Grund für das Absterben der Embryonen ist, wird dies für sehr unwahrscheinlich erachtet. Diese Vermutung stützt sich vor allem auf der Untersuchung der abgestorbenen Embryonen und den Vergleich dieser mit Kontrolltieren, wobei keine Anzeichen einer mangelhaften Mineralisierung der Knochen festgestellt werden konnte [77].

Auch der Faktor Geometrie scheint nicht der Grund für das Absterben der Embryonen zu sein. Die Untersuchungen von Haque [46] sowie eigene Beobachtungen haben gezeigt, dass eine zu flache Geometrie wie etwa bei der Auerbach-Kultur, vermehrt zu Deformationen, vor allem der Beine, führt [46]. Zusätzlich wurden eine schwache Kon-

stitution und Fehlpositionierungen der embryonalen Gliedmaßen beschrieben. In zylindrischen und eiförmigen Kulturbedältern konnte dies nicht beobachtet werden. Nach Kawashima sollte der optimale Kulturbedälter für die embryonale Entwicklung des Embryos in etwa dem entsprechenden Ei nachempfunden sein [52]. Dieser Aussage kann nach der Untersuchung verschiedener Geometrien zugestimmt werden.

Die Adaptation des Kamihira-Systems auf das Huhn zeigte ein enttäuschendes Ergebnis. Leider konnte nicht die gleiche Membran getestet werden, wie in der Originalveröffentlichung. Doch auch mit den beiden alternativen Membranen blieb das Ergebnis weit hinter den Erwartungen zurück. Die weiteste Entwicklung wurde mit den 2-lagigen Silikonformen erzielt. Mit diesem System wurde eine maximale Entwicklung bis Tag 21,5 erreicht. Eine Entwicklung bis zu diesem Zeitpunkt in einem komplett künstlichen System ist nur von Dunn beschrieben. Das verwendete Silikon ähnelt der Schalenmembran im Punkt Hydrophobizität sehr. Der Kontaktwinkel von $117,2^\circ$ liegt sehr nahe an dem der Schalenmembran mit 129° . Das Anwachsen der CAM auf dem künstlichen Material scheint hierdurch erleichtert zu werden. Bis Tag 10 der Entwicklung verläuft das Wachstum der CAM auf dem Silikon in einer ähnlichen Geschwindigkeit (etwa 0,5-0,6 cm pro Tag) wie im Ei ab. Nach Tag 10 ist eine Verlangsamung des Wachstums der CAM zu beobachten. Dies und die daraus folgende Verzögerung der vollständigen Bedeckung der Innenseite des Silikonbehälters um drei Tage weisen auf einen Mangel der Kulturform hin, der nicht auf die Oberflächeneigenschaften zurückgeführt werden konnte, da eine Beschichtung der Oberfläche keine Änderung im Wachstumsverhalten der CAM bewirkte.

Eine Verbesserung der Kultivierungsdauer in den Silikonformen konnte mit der Zugabe von Sauerstoff erreicht werden. Betrachtet man die Sauerstoffaufnahme des Hühnerembryos, so stellt man fest, dass diese ab Tag 7 zunimmt [84]. Die Möglichkeit in allen getesteten Behältern Embryonen für wenige Tage zu kultivieren, deutet darauf hin, dass der Hühnerembryo in diesem frühen Zeitraum kaum Sauerstoff benötigt. Das Themenfeld der embryonalen Atmung und des Gasaustausches im Ei wird von mehreren Faktoren bestimmt. Der maximale Umfang des Sauerstofftransports als auch der Bedarf sind keine festen Größen, sondern verändern sich beide im Laufe der Entwick-

lung des Embryos. Der Sauerstoffbedarf des Embryos steigt mit dessen Wachstum stetig an. Die Zunahme des Bedarfs, die mit der gemessenen Aufnahme von Bruteiern gleichgesetzt wird, steigt zwischen Tag 10 und 15 stark an (von 200 auf 500 ml O₂/Tag) und erreicht an Tag 19 sein Maximum mit 600 ml O₂/Tag [84]. Dieses Niveau wird bis zur Umstellung auf die Lungenatmung beibehalten und entspricht dem maximalen Transportniveau, das durch die Fläche der vollständig ausgebildeten CAM und der Porosität der Eierschale begrenzt wird. Die poröse Eierschale mit ihren 30 µm durchmessenden Poren [101] und ihren beiden fibrösen Schalenmembranen bilden eine sehr stark strukturierte und definierte Barriere für Gas und Flüssigkeit.

Auch die Sauerstoffkapazität des embryonalen Blutes verändert sich im Laufe der Entwicklung. Kann das embryonale Blut an Tag 10 der Entwicklung nur 8 cm³ Sauerstoff /100 ml Blut aufnehmen, so steigt dieser Wert durch die zunehmende Masse an Hämoglobin im Blutkreislauf auf 13 cm³/100 ml an Tag 18 an [100].

Die Aufgabe, diese sich verändernden Eigenschaften im vollständig künstlichen System abzubilden, wurde durch die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft zu lösen versucht. Tatsächlich wirkte sich die Zugabe von Sauerstoff positiv auf die maximale, aber auch auf die durchschnittliche Überlebensdauer aus. So konnte die maximale Entwicklungsdauer um 2,5 Tage, die durchschnittliche Entwicklungsdauer um 1,3 Tage verlängert werden. Die Wirkung des Sauerstoffs ist vor allem im Zeitraum zwischen dem 10. und dem 18. Tag zu vermuten, da eine weitere Erhöhung des Sauerstoffs über 36 % keine Verbesserung der Überlebenswerte brachte. Entgegen der Möglichkeit des Erstickens spricht das Ausbleiben von Zyanosen, subkutanen Ödemen und Blutungen im Kopf und Nackenbereich, welche als Anzeichen des Erstickens beschrieben sind [77]. Die weitere Erhöhung der Sauerstoffkonzentration könnte sich zytotoxisch ausgewirkt haben, allerdings ist dies nur eine Vermutung.

Daher muss ein weiterer Effekt vorhanden sein, der bei der Modifikation des Kultivierungsgefäßes und / oder des Protokolls nicht berücksichtigt wurde. Verglichen mit den anderen beschriebenen Systemen stellt sich das hier entwickelte Kultivierungssystem (2x Silikonform) hinsichtlich der maximalen Kultivierungsdauer als mindestens gleichwertig zu den Systemen von Dunn und Kamihira dar. Den drei anderen beschriebenen

Systemen ist es überlegen. Vergleicht man die Systeme anhand der durchschnittlichen Überlebensquoten, so ist dies nur mit dem Auerbachsystem möglich, da die restlichen Quellen hierzu keine Zahlen nennen. Die Silikonform ist der Auerbachkultur in diesem Punkt deutlich überlegen. Bezüglich der Dokumentationseigenschaften ist die Silikonform den anderen Kulturen weit voraus, da sie die Dokumentation von fast allen Seiten ermöglicht. Verglichen mit dem Kamihira-System weist die 2x Silikonform eine deutlich geringere Durchlässigkeit für Sauerstoff auf. Während bei der Teflonmembran, die Kamihira verwendete, bereits nach fünf Minuten die Sauerstoffkonzentration angeglichen war, dauerte dies bei der Silikonmembran über zwei Tage. Die Möglichkeit, dass die hier verwendeten Kulturbehälter eine zu geringe Sauerstoffpermeabilität aufweisen, kann letztendlich nicht ausgeschlossen werden, doch wird dies für eher unwahrscheinlich gehalten. Vielmehr wird die Teflonmembran von Kamihira als zu durchlässig erachtet. Die Tatsache, dass der Schlupf nach Kamihira seit jener Veröffentlichung nicht mehr wiederholt werden konnte, weder im Rahmen dieser Arbeit noch aus der Literatur bekannt, bestärkt diese Einschätzung. Es wird vermutet, dass die Teflonmembran durch eine zu hohe Durchlässigkeit für gasförmiges Wasser ein Austrocknen des Embryos begünstigt und die Kamihira-Kultur so nicht durchführbar ist. Zusammenfassend kann experimentell belegt die Behauptung aufgestellt werden, dass das neu entwickelte und getestete Kultivierungssystem das effektivste seiner Art und allen vergleichbaren Systemen in punkto maximal mögliche und durchschnittliche Überlebensdauer der Embryonen überlegen ist.

Welche Komponenten des Systems Hühnerrei zeigen grundlegende Eignung zur Kultivierung von Zellen und Geweben?

Die sehr unterschiedlichen Eigenschaften der Komponenten zwangen zur komponentenweise Untersuchung sowie unterschiedlichen Testverfahren. Zu Beginn wurden Zytotoxizitätstests (direkter Kontakttest, WST und BRDU) der VM durchgeführt. Diese zeigten keinen negativen Effekt auf die getesteten Zellen. Diese Beobachtung bestätigte

sich in den anschließenden Kultivierungsexperimenten. Eine ausgeprägte Asymmetrie der VM konnte bei den REM-Aufnahmen festgestellt werden. Diese wurde sowohl im Anwachsverhalten als auch bei der adipogenen Differenzierung festgestellt. Beide Seiten der VM zeigten unterschiedliche Ergebnisse auf. Begründet liegt diese Eigenschaft wahrscheinlich in der physiologischen Aufgabe der VM. Die Innenseite dient dem Embryo in der frühen Phase der Entwicklung als Kultursubstrat, wobei eine gute Adhäsion der Zellen hilfreich ist. Für die Kultivierung von Zellen ist diese Eigenschaft hingegen nicht vorteilhaft, da zu kultivierende Zellen bei der notwendigen Passage vor Erreichen der Konfluenz länger (bis 30 Minuten im Experiment) den Verdauungsenzymen ausgesetzt sind. Die Außenseite der VM stellt hingegen die letzte Barriere für eindringende Kontaminationen vor dem Embryo dar und sollte möglichst wenig Möglichkeit der Anhaftung und Durchdringung bieten. Bei der unerwartet schnellen adipogenen Differenzierung könnten in der VM vorhandene Reste von Dotter eine Rolle spielen. Während die hMSC in der In-vitro-Zellkultur die für die Fettvesikel notwendigen Lipide erst synthetisieren müssen, könnten die auf der VM kultivierten hMSC auf bereits im Dotter vorhandene Lipide zurückgreifen, was sich in einem zeitlichen Vorsprung beim Auftreten von Fettvesikeln äußert.

Die Kultivierung von Zellen unter direktem Kontakt zum Eiklar zeigte einen zytotoxischen Effekt und schließt es damit als ungeeignet zur Kultivierung von Zellen aus. Im Eiklar kommt z.B. Lysozym vor, das Polysaccharide der bakteriellen Zellwand angreift und dessen Wirkung schon lange bekannt ist [57]. Ein ähnlicher Effekt wurde, bei den im Experiment kultivierten Zellen vermutet und beobachtet. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Kultivierung von L929-Zellen in direktem Kontakt zum Dotter. Sowohl Dotter als auch Eiklar eignen sich daher nicht zur Kultivierung von Zellen.

Entgegen der Resultate im direkten Kontakt ist die Kultivierung von Zellen auf dem Dotter möglich. Anwachsverhalten, Ablöseverhalten, Kultivierbarkeit und adipogene Differenzierbarkeit zeigten ähnliche Ergebnisse wie die Versuche mit der VM. Ein irgendwie gearteter Effekt des Dotters auf die Zellkulturen konnte nicht festgestellt werden. Eine Diffusion von Bestandteilen des Dotters über die VM, die den zellschädigenden Effekt der direkten Kontaktierung bewirkt, konnte experimentell nicht bestätigt

werden. Die VM scheint für die Bestandteile des Dotters impermeabel zu sein. Ebenso wie die VM ist auch der Dotter als Kultursubstrat für die Kultivierung von Zellen geeignet.

Die Allantois in ihrer Funktion als Sammelbehälter für Stoffwechselendprodukte implizierte bereits im Vorfeld der Experimente die Ungeeignetheit zur Zellkultur. Eine deutliche Reduktion der FDA gefärbten CHO im direkten Kontakttest bestätigte die Vermutungen. In WST und BrdU-Tests sowie Kultivierungsversuchen wurde diese Erwartung ebenfalls bestätigt. Eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Stoffwechselaktivität wurde im WST-Test festgestellt. Je höher die Konzentration der Allantoisflüssigkeit in der Mediums-/Allantoisflüssigkeits-Mischung war, desto höher war auch der auftretende Effekt. Unerwartet zeigte sich die Zellproliferation im BrdU von der Konzentration unbeeinflusst. Eine Erklärung hierfür könnte im zeitverzögerten Auftreten des zellschädigenden Effektes liegen, der sich erst nach >24 Stunden, dem Zeitraum der Messung, bemerkbar machte. Die Möglichkeit in die Allantois injizierte Zellen und Sphäroide (in 1 ml Kulturmedium) noch 2-3 Tage dokumentieren zu können, ist ebenfalls bemerkenswert, erwartete man doch ein schnelles Absterben durch den Einfluss der Allantoisflüssigkeit. Erklärbar erscheint dieser Befund damit, dass das Verhältnis Medium zu Allantoisflüssigkeit in den Injektionsversuchen weiter auf der Seite des Mediums gelegen haben mag als abgeschätzt. Bei der Präparation der Allantoisflüssigkeit wurde im Durchschnitt eine Menge von 0,8 ml entnommen. Daraus wurde mit einem in der Allantois verbleibendem Rest ein Gesamtvolumen von 1 ml abgeschätzt, in das die Zellen injiziert wurden und einem Verhältnis von 50 % Allantoisflüssigkeit entspricht. Wenn das Gesamtvolumen aber geringer wäre, etwa 0,8 ml, würde sich das Verhältnis zu 44,4 % Allantoisflüssigkeit verschieben, was sich im WST als positiv erwiesen hat. Auf Grund dieser Befunde muss die Eignung der Allantois für die Kultivierung von Zellen verneint werden.

Ähnlich der Allantois bildet das Amnion einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum mit einer physiologischen Aufgabe. Diese besteht im Schutz des Embryos vor Stößen. Da sich der Embryo in direktem Kontakt zur Amnionflüssigkeit entwickelt, wurde hier von keinem zelltoxischen Effekt ausgegangen. Überraschend stellte sich jedoch ein solcher

Effekt bei der 14 tägigen Kultivierung von CHO-Zellen mit Amnionflüssigkeit und der anschließenden L/T-Färbung heraus. Dieser zeigte sich in einer deutlichen Reduktion der Anzahl FDA gefärbten Zellen. Auch die weiteren Zytotoxizitätstests und Kultivierungsversuche bestätigten diesen Befund. Interessanterweise ergab der mit der Amnionflüssigkeit durchgeführte BrdU-Test keinen konzentrationsabhängigen Effekt. Der bereits weiter oben erwähnte Erklärungsversuch, dass der toxische Effekt sich erst nach einem längeren Zeitraum auf die Proliferation auswirkt, kann auch in diesem Fall zur Anwendung gebracht werden. An dieser Stelle muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass die durch die Kultivierung der Zellen in Amnion- und Allantoisflüssigkeit hervorgerufenen Effekte nicht durch den BrdU-Assay abgebildet werden können. Das der festgestellte zellschädigende Effekt von einer Unterversorgung mit Nährstoffen herrührt, kann durch die In-vitro-Kultivierung, bei der regelmäßig ein Mediumswechsel stattfand, verneint werden. Die Zellen des Embryos müssen über einen Mechanismus verfügen, der sie vor einem schädigenden Effekt schützt. Diese Erkenntnis ist sehr überraschend, da sie unerwartet auftrat. Zur Kultivierung von Fremdzellen ist das Amnion ebenso wie die Allantois nicht geeignet.

Für die Untersuchung der CAM auf ihre Eignung zur Zellkultur konnte nur auf Kultivierungsexperimente zurückgegriffen werden. Die Nutzung der CAM etwa zur Kultivierung von Tumoren [75] oder von Fremdgewebe [30] lässt eine Kompatibilität zur Zellkultur vermuten. Die Kultivierung von CHO im Gelatineschwamm war problemlos über acht Tage ohne Mediumswechsel möglich. Ein konstant deutliches GFP-Signal der Einzelzellen sowie der Sphäroide bestärkte die Einschätzung der Eignung der CAM als geeignetes Zellkultursubstrat.

Von den sechs getesteten Komponenten des Hühnereies haben sich nur zwei, die VM und die CAM, als geeignet erwiesen. Nur auf der VM und der CAM erscheint eine längerfristige Kultivierung von Zellen und Geweben möglich. Von den beiden Strukturen erscheint die CAM zum Anschluss eines Gewebes an das Blutgefäßsystem, dem Schlüsselexperiment dieser Arbeit, wiederum besser geeignet, da sie über Blutgefäße in räumlicher Nähe zum kultivierten Material verfügt.

Eignet sich das System Hühnerei für die Generierung von Geweben im Tissue Engineering?

Die wissenschaftliche Nutzung der CAM beschränkt sich fast ausschließlich auf die Nutzung für Irritationstests [62] und die Tumorkultivierung [75]. In dieser Arbeit stehen allerdings die Kultivierung von Zellen und Geweben sowie das Wachstum von Blutgefäßen im Vordergrund. Nur sehr vereinzelt können hierzu Veröffentlichungen gefunden werden [6]. Ein wichtiger Punkt, der die Eignung der CAM zur Vaskularisierung von Geweben neben den durchgeführten Kultivierungsexperimenten unterstreicht, ist die Immuntoleranz des Hühnerembryos [96].

Der Anschluss der Herzmuskelsphäroide (HMS) an das Gefäßsystem des Hühnerembryos konnte bereits nach 24 Stunden Kultivierung der Herzmuskelsphäroide erreicht werden, was einer Wachstumsgeschwindigkeit der Blutgefäße von mindestens 0,125 mm pro Stunde entspricht. Der Erhalt der Eigenkontraktion von 80 % der angeschlossenen Sphäroide ist, ebenso wie das Auftauchen einer roten Färbung in den HMS als positiv zu bewerten da sie auf den Anschluss an das Gefäßsystem hindeuten. Der Nachweis von Blutgefäßen in den Sphäroiden, vor allem aber die Beobachtung des rhythmischen Erscheinens und Verschwindens der roten Färbung bei einigen Sphäroiden, soll hier als Nachweis der grundlegenden Eignung des Systems zum Anschluss von Fremdgeweben an das Blutgefäßsystem dienen. Die geringe Überlebensdauer der Embryonen muss als Interaktion des Fremdgewebes mit dem Hühnerembryo verstanden werden, was auch auf den Anschluss an das Gefäßsystem des Embryos hindeutet. Da eine Beeinflussung durch das Kultivierungsmedium ausgeschlossen wurde, ist diese Vermutung naheliegend und wahrscheinlich. Erklären lässt sich die kurze Überlebenszeit der Embryonen mit angeschlossenen HMS durch einen schädigenden Effekt, der von den HMS ausgeht. Vorstellbar wäre eine Störung des Taktes des embryonalen Herzens durch die taktgebenden Zellen des HMS. Sollte die selbstständige Verbindung zum Fremdgewebe bei anderen Modellgeweben nicht stattfinden, besteht immer noch die Möglichkeit diese durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren anzuregen.

Neben dem Anschluss eines Gewebes an das Blutgefäßsystem des Embryos konnte die Eignung zur Co-Kultivierung von Säugetier- und Hühnerzellen festgestellt werden. Die-

se Möglichkeit zur Co-Kultur wurde in mehreren In-vitro- und In-vivo-Experimenten gezeigt. Sie bildet eine wichtige Voraussetzung für die Generierung von Organen und Geweben, da eine Inkompatibilität der beiden Zelltypen dem gesamten Ansatz die Grundlage entziehen würde. Die hohe Immuntoleranz des Hühnerembryos dürfte der Hauptgrund für die Kompatibilität zu fremden Zellen. Ein weiterer Faktor ist die maximale Nutzungsdauer des Modellsystems Hühnerei. 21 Tage, von denen nur etwa 8 zur Kultivierung genutzt werden können, sind für die Generierung eines vollständigen Gewebes oder sogar Organs viel zu wenig. Grundsätzlich besteht natürlich die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Spezies mit längerer Brutdauer. So wären die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation etwa auch mit dem Modellsystem der Strauße durchführbar gewesen. Die Verlängerung dieser Nutzungsdauer wäre neben dem Wechsel des Modells eine zielführende Möglichkeit. Die Verzögerung der Entwicklung unter Erhalt der lebenswichtigen Funktionen des Embryos durch Absenkung der Inkubationstemperatur wurde hier untersucht. Im Perry-System gelang eine Retardierung der Entwicklung um bis zu zwei Tage. Ein erfolgreicher Schlupf konnte mit diesen Embryonen allerdings nicht mehr durchgeführt werden, da sie zu schwach für den kraftraubenden Schlupf waren. Für eine Gewebekultur auf der CAM bedeutet eine verlängerte Kulturzeit um zwei Tage eine Verlängerung der Nutzungsdauer um 25 %. Ausreichend für die Generierung größerer Gewebe oder gar Organe ist das bei weitem noch nicht. Hier muss bei einer weiteren Verfolgung des Ansatzes die Machbarkeit eines Transfers in ein weiteres Ei überprüft werden. Beide Wege, die Nutzung eines anderen Modellsystems sowie die Nutzung mehrere Embryonen nacheinander, scheinen die Möglichkeit zu bieten, einem an das Gefäßsystem angeschlossenen Gewebe die Zeit zu ausreichendem Wachstum zu ermöglichen. Die Retardierung der embryonalen Entwicklung durch Absenken der Inkubationstemperatur könnte hierbei ebenfalls hilfreich sein.

Ausblick

Nach abschließender Beurteilung der experimentell gewonnen und der Literatur entnommenen Daten kann die Machbarkeit des Ansatzes dieser Arbeit bestätigt werden. Die nächsten Schritte wären der Anschluss eines anwendungsbezogenen Modellgewebes an das Gefäßsystem und dessen Kultivierung im Ei. Ist dieser Schritt erfolgreich

durchgeführt, wäre die Stabilisierung der embryonalen Überlebensquote notwendig. Denn nur wenn das angeschlossene Gewebe und der Embryo ihre maximal mögliche Wachstumszeit erreichen, kann die Kultivierung effektiv durchgeführt werden. Der folgende Schritt müsste eine Verpflanzung dieses Gewebes und den erneuten Anschluss an eine Versorgungsquelle, sei es ein weiterer Embryo oder eine künstliche Pumpe, darstellen. Als größtes Hemmnis wird hierbei nicht die Überführung an sich, sondern der erneute Anschluss an ein Gefäßsystem angesehen. Je nach Größe der Blutgefäße im kultivierten Gewebe könnte eine gefäßchirurgische Lösung des Problems möglich sein. Mit diesem Schritt wäre die Limitation der individuellen Kultivierungsdauer des Hühnerembryos überwunden.

5 Literaturverzeichnis

[1]	Abdul-Ghani S, Yainai J, Abdul-Ghani JR, Pinkas A, Abdeen Z (2012) The teratogenicity of di(1-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-butyl Phthalate (DBP) in a chick model. <i>NeurotoxicolTeratol.</i> 34:56-62
[2]	Alajati A, et al. (2008) Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice. <i>Nat. Methods</i> 5:439–445
[3]	Allan JS, Rose GA, Choo JK et al. (2001) Morphometric analysis of miniature swine hearts as potential human xenografts. <i>Xenotransplantation</i> 8:90-93
[4]	ARGUSCOPE.COM Produktinformation (15.07.2015). www.Arguscope.com/index.php . Zugegriffen 15.Juli 2015.
[5]	Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J (1974) A simple procedure for long term cultivation of chicken embryos. <i>Dev Biol.</i> 41:391-394
[6]	Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. <i>ClinChem.</i> 49:32–40
[7]	Baggott G (2001) Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments. In: Deeming DC (ed) <i>Perspectives in Fertilisation and Embryonic Development in Poultry</i> . Lincolnshire, pp 23-29
[8]	Bailey L et al. (1985) Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. <i>JAMA</i> 254:3321-9
[9]	Balmert SC, McKeel D, Triolo F, Gridelli B, Zeilinger K, Bornemann R, Gerlach JC(2011) Perfusion circuit concepts for hollow-fiber bioreactors used as in vitro cell production systems or ex vivo bioartificial organs. <i>Int J Artif Organs.</i> 34:410-21
[10]	Bäumer-Schleinkofer, Ä (1993) <i>Die Geschichte der Beobachtenden Embryologie: Die Hühnerentwicklung als Studienobjekt über zwei Jahrtausende</i> . Verlag Peter Lang. Frankfurt
[11]	Bellaire R, Harkness M, Harkness RD (1963) The vitellin membrane of the hen's egg: a chemical and electron microscopical study. <i>J. Ultrastruct. Res.</i> 8:339-359
[12]	Bellaire R (1961) The structure of the yolk of the hen's egg as studied by electron microscopy. <i>J BiophysBiochemCytol</i> 11:207-225
[13]	Bergtold WH (1917) <i>A Study of the incubation periods of birds</i> . the Kendrick-Bellamy Co. Press of Carson-Harper CO, Denver
[14]	Bliquez LJ (1996) Prosthetics in classical antiquity: Greek, Etruscan and Roman prosthetics. In: Haase W, Temporini H (eds) <i>Aufstieg und Niedergang der Römischen Welt II</i> . Walter de Gruyter, Berlin und New York, 2640-2676
[15]	Bloch O, Golde P, Dohmen P, Posner S, Konertz W, Erdbrugger W (2011) Immune Response in Patients Receiving a Bioprosthetic Heart Valve: Lack of Response with Decellularized Valves. <i>Tissue Engineering</i> 17: 2399-2405
[16]	Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR (2003) Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. <i>The anatomical record Part A: Discoveries in molecular, cellular and evolutionary Biology</i> 272A:497-502
[17]	Bonner-Fraser M (1996) <i>Methods in Cell Biology Volume 51 Methods in avian embryology</i> . Academic Press, San Diego
[18]	Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Bondoc CC, Jung WK (1981) Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. <i>Ann.Sur.</i> 194:413-428
[19]	Burley RW, Vadehra DV (1989) <i>The avian egg; chemistry and biology</i> . Wiley, New York
[20]	Burnet F (1936) The use of the developing egg in virus research. <i>Med. Res. Council Spec. Rep. Ser. Nr. 220</i>
[21]	Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA (1997) Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. <i>Plastreconstr surg.</i> 100:297–302

[22]	Carlson BM (2007) Principles of regenerative biology. Elsevier Academic Press, San Diego
[23]	Carpenter K (1999) Eggs, Nests and Baby Dinosaurs: A Look at Dinosaur Reproduction (Life of the Past). Indiana University Press, Bloomington
[24]	Carrino DA, Dennis JE, Wu TM, Arias JL, Fernandez MS, et al. (1996) The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization, Connect Tissue Res. 35:325-9
[25]	Cooper DK, Satyananda V, Ekser B, van der Windt DJ, Hara H, et al. (2014) Progress in pig-to-non-human primate transplantation models (1998–2013): a comprehensive review of the literature. Xenotransplantation21:397–419
[26]	Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF (2011) An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials32:3233–3243
[27]	Csonka FA, Olsen MW (1949) Function of egg white in embryonic development. ProcSocExpBiol Med 72:479
[28]	David KC, Cooper T, Gollackner B, David H (2002) Will the pig solve the transplantation Backlog? Sachs Annual Review of MedicineVol. 53:133-147
[29]	Deeming DC (1991) Reasons for the dichotomy in egg turning in birds and reptiles. In: Deeming DC, Ferguson MW (ed) Egg incubation: Its effects on embryonic development in birds and reptiles. Cambridge University Press, Cambridge, pp 307-323
[30]	Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP, Dünker N (2009) Chick ex ovo Culture and ex ovo CAM Assay: How it Really Works. JoVE. 33 http://www.jove.com/details.php?id=1620
[31]	Draize JH, Woodard G, Calvery HO (1944) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J. Pharmacol. And Exp. Therapeutics 82:377–390
[32]	Drews U (2006) Taschenatlas der Embryologie, Thieme, Stuttgart
[33]	Dunn BE, Boone MA(1976) Growth of the chick embryo in vitro, Poultry Science 55:1067-71
[34]	Dunn BE, Graves JS, Fitwarris TP (1981) Active calcium transport in the chick chorioallantoic membrane requires interaction with the shell membrane and/or shell calcium. Dev. Biol 82:259-268
[35]	Elaroussi M, Uhland-Smith A, Hellwig W, DeLuca H (1994) The role of vitamin D in chorioallantoic calcium transport. BiochimBiophysActa 1192:1-6
[36]	EUROTRANSPLANT.ORG Informationsseite (15.07.2015) Annual Report 2013. www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=newsitems&action=viewitem&oid=458&id=5272 . Zugegriffen: 15.Juli.2015
[37]	Eycleshymer AC (1906) Some observations and experiments on the natural and artificial incubation of the egg of the common fowl. Biol. Bull. Woods hole 12:360-74
[38]	Fasenko GM (2007) Egg storage and the embryo. Poult. Sci. 86:1020–1024
[39]	Freed LE, Vunjak-Novakovic G (1998) Culture of organized cell communities. Adv Drug Deliv Rev 33:15-30
[40]	Funk EM, Biellier HV (1944) The minimum temperature for embryonic development in the domestic fowl (Gallus domesticus). Poult. Sci. 23:538–540
[41]	Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, et al. (2009) Mechanism of egg contamination by salmonella enteritis. FEMS Microbiol Rev 33:718–738
[42]	Gerlach JC et al. (2003) Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. Transplantation 76:781-786
[43]	Gilbert S (2006) Developmental Biology. Eighth Edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland
[44]	Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF (2006) Decellularization of tissues and organs. Biomaterials 27:3675–3683
[45]	Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morph 88:49-67

Literaturverzeichnis

[46]	Haque S (2010) New approach to in vitro culture of animal cells and tissue engineering. Dissertation. Universität des Saarlandes
[47]	Hoshiba T. et al. (2010) Decellularized matrices for tissue engineering. <i>Exp. Opin. Biol. Ther.</i> 10:1717–1728
[48]	Jensen C (1969) Ultrastructural changes in the avian vitelline membrane during embryonic development. <i>Embryol. Exp. Morph.</i> 21:4467-84
[49]	Kain KH, Miller JW, Jones-Paris CR, Thomason TR, Lewis JD, et al. (2014) The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. <i>Developmental dynamics</i> 243:216-228
[50]	Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM (2000) Angiogenese und Vaskulogenese: Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation, <i>Herz</i> 6:611-622
[51]	Kamihira M, Oguchi S, Tachibana A, Kitagawa Y, Iijima S (1998) Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. <i>Dev Growth Differ</i> 40:449-55
[52]	Kawashima T., Kumata K., Tamaki Y., Kuwana T., Hashimoto K (2005) An avian embryo culture system for embryogenesis using an artificial vessel: Possible conservation benefits in the rescue and management of endangered avian species. <i>Zoo Biology</i> 24:519-529
[53]	Korhonen A, Hemminki K, Vainio H (1982) Application of the chicken embryo in testing for embryotoxicity. <i>Scand J Work Environ Health</i> 8:63-69
[54]	Kunzi-Rapp K, Genze F, Küfer R, E. Reich E, Hautmann RE, Gschwend JE (2001) Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. <i>J. Urol.</i> 166:1502-1507
[55]	Lai Y, Liu J (2015) Transparent soft PDMS eggshell, <i>Sci China Tech Sci</i> 58:273-283
[56]	Lanza R, Langer R, Vacanti J (eds) (2007) Principles of tissue Engineering Third edition. Elsevier Academic Press, Burlington
[57]	Laschtschenko P (1909) Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnerereiweiß. <i>Z.Hg. InfektKrankh</i> 64:419-427
[58]	Leach RM (1982) Biochemistry of the organic matrix of the eggshell. <i>Poult. Sci.</i> 61:2040–7
[59]	Lee V, Singh G, Trasatti JP, Bjornsson C, Xu X, et al. (2014) Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. <i>Tissue Engineering Part C: Methods</i> 6:473-484
[60]	Li-Chan E, Nakai S (1988) Hydrophobic interactions in food systems. CRC Press, Boca Raton
[61]	Lindl T (2002) Zell- und Gewebekultur, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
[62]	Lüpke N, Kemper F (1986) The HET-CAM Test: An alternative to the Draize Eye Test. <i>Fd Chem. Toxic.</i> 24:495-496
[63]	Maghni K, Nicolescu O.M., Martin J.G., (1999) Suitability of cellmetabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cellproliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. <i>J Immunol Methods</i> 223:185-194
[64]	Mann K (2008) Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. <i>Proteomics</i> 8:2322-2332
[65]	Marcacci M, Berruto M, Brochetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, et al. (2005) Articular cartilage engineering with hyalograft C:3-year clinical results. <i>ClinOrthopRelat Res.</i> 435:96-105
[66]	Martin Y, Vermette P (2005) Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. <i>Biomaterials</i> 26:7481-503
[67]	Mayr G, Pohl B, Peters S (2005) A well-Preserved Archaeopteryx specimen with theropod features. <i>science</i> 310:1483-1486
[68]	Menger B, Vogt PM, et al. (2010) Applying amphibian limb regeneration to human wound healing: a review. <i>Ann plast surg.</i> 65:504-510
[69]	METHUSALAH FOUNDATION Informationsseite (23.10.2014) www.neworgan.org/prize.php.html . Zugegriffen: 23. Oktober 2014.
[70]	Mine Y (2008) Egg Bioscience and Biotechnology. Wiley, New York

[71]	Mironov V, et al. (2009) Organ printing: tissue spheroids as building blocks. <i>Biomaterials</i> 30:2164–2174
[72]	Mlikovsky J (2003) Eggs of extinct aepyornithids (Aves: Aepyornithidae) of Madagascar: Size and taxonomic identity. <i>Sylvia</i> 39:133-139
[73]	Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. <i>J Immunol Methods</i> 65 (1-2): 55-63.
[74]	Müller W, Hassel M (2012) <i>Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen und bedeutender Modellorganismen</i> , 5. Auflage. Springer Spektrum, Heidelberg
[75]	Murphy JB (1913) Transplantability of tissues to the embryo of foreign species. It's bearing on questions of tissue specificity and tumor immunity. <i>J Exp Med.</i> 17:482-493
[76]	Nakano T, Ikawa LI, Ozimek N (2001) Extraction of glycosaminoglycans from chicken eggshell. <i>Poult. Sci.</i> 80:681–4
[77]	Narbaitz R, Tsang C (1989) Vitamin D deficiency in the chick embryo: effects on prehatching motility an on the growth and differentiation of bones and parathyroid glands. <i>Calcif Tissue Int</i> 44:348-55
[78]	New D (1957) A critical period for the turning of hens eggs, <i>J. Embryol. Exp. Morph.</i> 3:293-299
[79]	Nys Y, Gautron J, Garcia-Ruiz JM, Hincke MT (2004) Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins. <i>C.R. Palevol</i> 3:549-562
[80]	Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, et al. (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. <i>Nature Medicine</i> 14:213-221
[81]	Owczarzak A (1971) Calcium absorbing cell of the chick chorioallantoic membrane. <i>Exp. Cell Res.</i> 68:113-129
[82]	Perry M (1988) A complete culture system for the chicken embryo. <i>Nature</i> 331:70-72
[83]	Petersen TH, et al. (2010) Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. <i>Science</i> 329:538–541
[84]	Rahn H, Paganelli CV, Ar A (1974) The avian egg: Air-cell gas tension, metabolism and incubation time, <i>Respiration Physiology</i> 22:297-309
[85]	Randles CA, Romanoff AL (1950) Some physical aspects of the amnion and allantois of the developing chick embryo. <i>J. exp. zool.</i> 114:87-101
[86]	Ribatti D, De Falco G, Nico B, Ria R, Crivellato E, Vacca A (2003) In vivo time-course of the angiogenic response induced by multiple myeloma plasma cells in the chickembryochorioallantoic membrane. <i>J.Anat.</i> 203:323-328
[87]	Rode S (2007) <i>Das Chorionallantoismembran-Modell in der Tumorforschung: Untersuchungen zur Kombination von Bestrahlung und Antiangiogenese bei der Tumorthherapie</i> . Dissertation. Universität Halle
[88]	Romanoff AL, Romanoff AJ (1949) <i>The avian egg</i> . Wiley, New York
[89]	Schmitz S (2007) <i>Der Experimentator: Zellkultur</i> . Elsevier, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
[90]	Schnorr B, Kressin M (2011) <i>Embryologie der Haustiere</i> , 6. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart
[91]	Schomann T, Qunnais F, Widera D, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B (2013) Improved Method for Ex Ovo-Cultivation of Developing Chicken Embryos for Human Stem Cell Xenografts. <i>Stem Cells Int.</i> 2013:960958
[92]	Schumann J (2010) Teratogen Screening: State of the Art. <i>Avicenna Journal of Medical Biotechnology</i> , 2(3): 115–121
[93]	Soares L, Parisi M, Bonini M (2014) Axon injury and regeneration in the adult drosophila. <i>Sci Rep.</i> 4:6199
[94]	Solomon SE (1991) <i>Egg and eggshell quality</i> . Wolfe publishing, Aylesbury
[95]	SPEKTRUM DER WISSENSCHAFT VERLAGSGESELLSCHAFT mbH (23.10.2014) www.spektrum.de/frage/wie-viele-zellen-hat-der-mensch/620672.html . Zugegriffen: 23.Oktober 2014

Literaturverzeichnis

[96]	Staton CA, Reed MW, Brown NJ (2009) A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. <i>Int J ExpPathol</i> 90:195-221
[97]	Stewart M, Terepka A (1969) Transportfunctions of the chick chorio-allantoic membrane. <i>Experimental cell research</i> 58:93-106
[98]	Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W (1986) Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. <i>Cancer Res</i> 46:5320-9
[99]	Tamimie HS, Fox MW (1967) Effect of continuous and intermittent light exposure on the embryonic development of chicken eggs. <i>Comp. Biochem. Physiol.</i> 20:793-799
[100]	Tazawa H (1980) Oxygen and CO ₂ exchange and acid-base regulation in the avian embryo. <i>Am Zool</i> 20:395-404
[101]	Toien O, Paganelli VC, Rahn H, Johnson R (1988) Diffusive resistance of avianeggshell pores. <i>Respiration Physiology</i> 74:345-354
[102]	Trziszka T, Smolinska T (1982) Chemical characterization of the vitelline membrane of hens' eggs. <i>Food Chemistry</i> 8:61-70
[103]	Vacanti JP (1988) Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture. <i>Arch Surg</i> 123:545-9
[104]	Vadehra DV, Baker RC, Naylor HB (1970) Role of cuticle in spoilage of chicken eggs. <i>Journal of food science</i> 35:5
[105]	Vander A, Sherman J, Luciano D (2013) <i>Human physiology</i> . McGraw-Hill, New York
[106]	Warburg O, Minami S (1923) Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. <i>Biochem Z</i> 142:317-33
[107]	Wolpert L et al. (1999) <i>Entwicklungsbiologie</i> . Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
[108]	Yuan Y, Lee TR (2013) Contact Angle and Wetting Properties. <i>Surface Science Techniques</i> 51: 3.34
[109]	Zeilinger K, Schreiter T, Darnell M, Söderdahl T, Lübberstedt M, et al.(2011) Scaling down of a clinical three-dimensional perfusion multicompartement hollow fiber liver bioreactor developed for extracorporeal liver support to an analytical scale device useful for hepatic pharmacological in vitro studies. <i>Tissue Eng Part C Methods</i> . 17:549-56

6 Anhang

Inkubatoren für In-ovo-/In-vitro-Kulturen des Hühnerembryos

Im Folgenden sind Detailansichten der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und evaluierten Inkubatoren dargestellt.

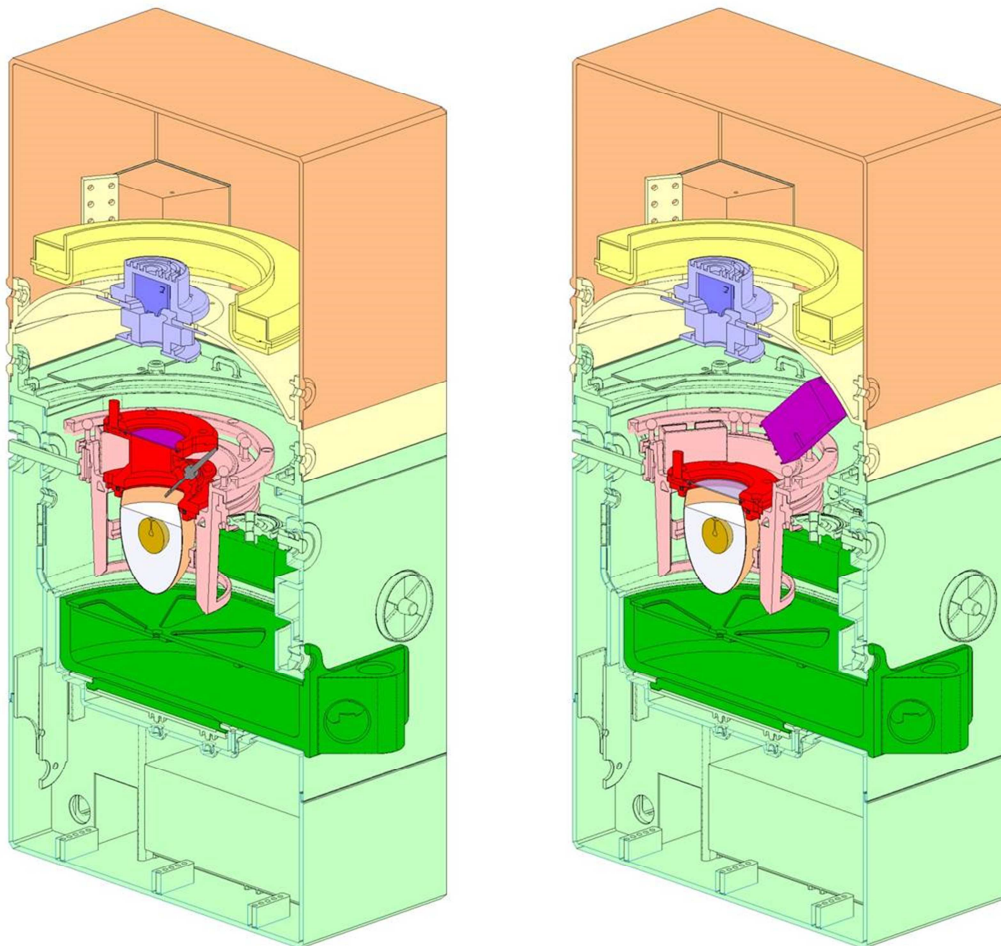


Abbildung 59: Schnittzeichnung des Inkubators für eine In-ovo-Kultur. Links: Mit In-ovo-Kultur und Manipulationsdeckel. Als Deckelheizung findet die ITO-Widerstandsheizung Anwendung. Rechts: Mit In-ovo-Kultur und Dokumentationsdeckel. Als Deckelheizung findet die Warmluftgebläse-Heizung Anwendung

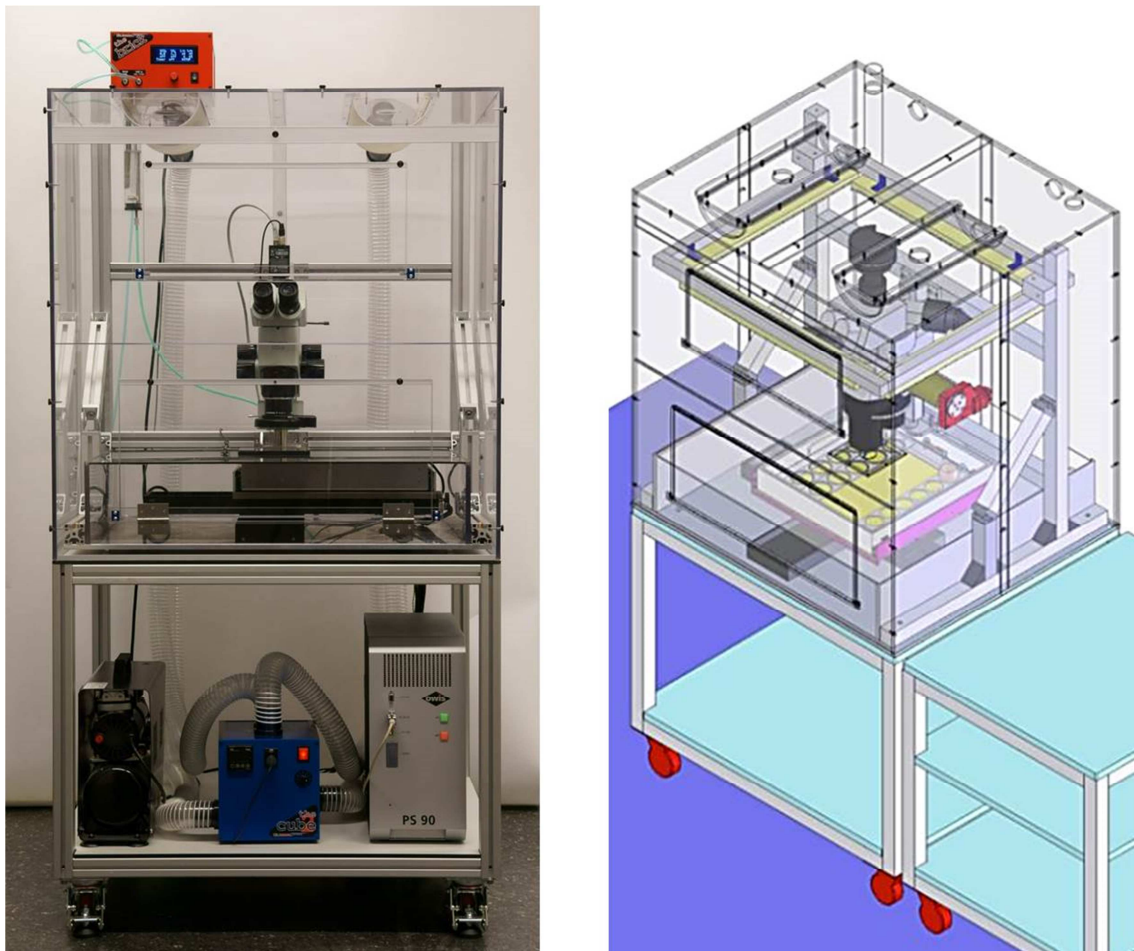


Abbildung 60: Detailansicht des Inkubators für bis zu 24 In-ovo-Kulturen. Links: Frontalaufnahme des Inkubators mit Binokular zur Dokumentation der Kulturen. Rechts: Schemazeichnung des Inkubators mit zusätzlicher Bewegungsachse am z-Trieb des Binokulars für die automatische Fokussierung

7 Publikationen/Dank

Publikationen

Mohrhardt E, Schmitt D, Gorjup E, Howitz S, Zimmermann H, et al. (2015) A Novel Fully Automated Incubation, Manipulation and Documentation System for the Avian Embryogenesis. J Biotechnol Biomater 5: 202.

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere sind dies:

Herr Prof. Dr. G. R. Fuhr für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Fraunhofer IBMT sowie der umfangreichen und erfrischenden Diskussionen und Denkanstöße.

Frau Prof. Dr. J. Engel für die Übernahme des Korreferats.

Herr Dr. E. Gorjup für die zielführende Betreuung sowie die lehrreichen und kritischen Diskussionen und Denkanstöße.

Herr D. Schmitt, Frau L. Peter, Herrn M. Beneke für die Unterstützung bei der Konstruktion und dem Aufbau der Inkubatoren und der Deckelsysteme sowie der Programmierung der zugehörigen Software.

Publikationen/Dank

Frau A. Hecker für die Unterstützung bei der Durchführung der Zytotoxizitätstests und der Generierung der Herzmuskelsphäroide.

Frau J. Bungert für die Durchführung der Kryoschnitte.

Frau Dr. A. Katsen-Globa für die Generierung der rasterelektronischen Aufnahmen.

Herr A. Brenner für die Unterstützung und Diskussion bei der Kontaktwinkelmessung.

Meiner Frau Karina Mohrhardt für die das notwendige Unterstützungsfeuer und die Flankensicherung während dieser Arbeit.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Elmar Mohrhardt

Anschrift: Kollwitzstraße 8, 66424 Homburg

Geburtsdatum: 11.11.1984

Geburtsort: Kaiserslautern

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

2004: Abitur am Sickingen-Gymnasium in Landstuhl

2004-2005: Grundwehrdienst bei 7.ABC-Abwehr-Bataillon 750 in Bruchsal

2005-2011: Studium der Biomedizinischen Chemie an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz

2010-2011: Diplomarbeit am Max Planck Institut für Polymerforschung in Mainz und AIT in Wien

2011-2016: Promotion in der Hauptabteilung Bioprozesstechniken und Nanotechnologie am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St.Ingbert

Lebenslauf

Tätigkeiten

- 2008-2012: Ausbildung zum Reserveoffizier in der Bundeswehr
- 2009-2010: Tätigkeit als Hilfwissenschaftler am Max Planck Institut für Polymerforschung in Mainz
- 2012-dato: Menschenführung, Personalmanagement und Lehrtätigkeit als Reserveoffizier im Rahmen von Wehrübungen