

Zusammenfassung

Die Perfusionskultur bietet den Vorteil, daß Gingivaexplantate unter einfachen experimentellen Voraussetzungen über einen Zeitraum von 3 Wochen in lebender Form konserviert werden können. Somit rückt die Verwendung lebend konservierter Gingivaexplantate für autogene Transplantationen in greifbare Nähe. Gingiva wurde gesunden Patienten bei Molarenextraktionen entnommen und ohne Subkultur oder enzymatische Disaggregation in einen Gewebeträger eingelegt und in Perfusionskultur genommen. Zum Zeitpunkt der Entnahme und nach 7, 14 und 21 Tagen Perfusionskultur mit serumfreiem Keratinocyte-Growth-Medium wurden die Epithelien morphologisch auf ihre Integrität und immunhistochemisch mit Zytokeratin- und Vimentinantikörpern auf ihre gewebetypische Proteinexpression untersucht. Eine Schichtung des kultivierten Epithelverbands vom Stratum basale bis zum Stratum corneum war über 21 Tage hinweg zu erkennen. Die immunhistochemischen Resultate zeigten eine gewebespezifische Zytokeratinexpression mit Antikörpern gegen die Zytokeratine CK 5/6, CK 14 und CK 19 über den gesamten Kulturzeitraum von 3 Wochen. Vimentin war nach 7-tägiger Kultur in der Fibroblastenschicht und in geringem Maß vereinzelt in allen Epithelschichten zu erkennen. Die Verwendung von konservierten Gingivaexplantaten aus der Perfusionskultur als autogenes Transplantat soll nun auf seine medizinische Anwendbarkeit überprüft werden.

Schlüsselwörter

Gingiva · Epithel · Zellkultur · Transplantat

Lebende Langzeitkonservierung von humaner Gingiva in der Perfusionskultur

P. Lehmann¹, S. Kloth¹, J. Aigner¹, R. Dammer², W. Minuth¹

¹Institut für Anatomie, Universität Regensburg
(Abteilungsleiter: Prof. Dr. Will Minuth)

²Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Regensburg (Direktor: Prof. Dr. Herbert Niederdellmann)

In unseren Experimenten wurden frisch entnommene Gingivabiopsien auf einen Gewebeträger aufgespannt und in Kultur genommen. Ziel der Kultur war es, Gingiva ohne eine Zerstörung des Epithelverbands über einen längeren Zeitraum ohne Subkultivation zu halten, um das Gewebe in möglichst intakter Form zu konservieren und die gingivaspezifischen Epitheleigenschaften sicherzustellen.

Mit einer neu entwickelten Perfusionskulturtechnik konnten die Gingivaexplantate ohne die sonst übliche enzymatische Disaggregation auf speziellen Gewebeträgern befestigt werden. Diese Träger wurden dann in Kulturcontainer, sog. Kammern, eingelegt, die eine Annäherung an das gewebetypische Mikroenvironment ermöglichen [6]. Serumfreies Keratinocyte-Growth-Medium, eine Keratinozytenspezifische Modifikation von MCDB 153, wurde während der mehrwöchigen Kultur verwendet [9, 11]. Permanent wurden die Kulturen dabei mit frischen und damit unverbrauchten Medien versorgt und die Metaboliten kontinuierlich abgeführt.

In unseren Versuchsreihen wurde geprüft, inwieweit nach einer mehrwöchigen Kultur der morphologische Erhaltungszustand und die typische Zytokeratinexpression in den Gingivaexplantaten erhalten geblieben waren. Damit wurde einerseits überprüft, ob

eine morphologische Integrität im Epithel konserviert wurde. Andererseits wurde untersucht, ob es zu einer Veränderung der Proteinexpression, z. B. zu einer Down-Regulation von gewebetypischen Zytokeratinen, gekommen war. Daraus sollten Rückschlüsse gezogen werden, ob sich zellbiologische Charakteristika in den konservierten Explantaten möglicherweise stark verändert hatten und deshalb einer chirurgischen Anwendung zu Transplantationszwecken entgegenstanden.

Mit der vorgestellten Methode zur Gewinnung eines autogenen Wundverschlusses sollen erste Herstellungsprinzipien für Heilunginseln nach 2-zeitigen operativen Eingriffen erarbeitet werden. Da es sich beim isolierten Zellmaterial um autogenes Gewebe handelt, kann auf eine immunsuppressive Therapie, wie sie sonst im Rahmen allogener Transplantate notwendig wird, verzichtet werden [2].

Material und Methode*Explantatgewinnung*

Bei der Entfernung endständiger Molaren konnten von 7 Patienten mit unauffälliger Anamnese unter sterilen Bedingungen 19 etwa 2 × 2 mm² große Gingivastückchen entnommen und in 4°C gekühltem sterilen Transportmedium aufgenommen werden. Unter einer Sterilbank wurde jedes Gewebestückchen zur Minimierung von Infektionen 5mal in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,5) gewaschen. Daraufhin wurde die Fibroblastenschicht unter einer Binokularlupe weitgehend abpräpariert.

Dr. Petra Lehmann, Institut für Anatomie und Morphologie, Universität Regensburg, D-93040 Regensburg

Living long-term conservation of human gingiva in perfusion culture

P. Lehmann, S. Kloth, J. Aigner, R. Dammer, W. Minuth

Summary

Perfusion culture offers the advantage of keeping gingiva alive for a long time as an stable explant according to cell biological parameters. To investigate the suitability of cultured human gingival explants for transplantations the biopsies were put into a newly developed perfusion chamber and cultured for at least 21 days. Gingiva explants were derived from healthy donors undergoing surgical removal of molar teeth. The tissue pieces were cultured without prior proteolytic desintegration or subculture. Immediately after excision a morphological and immunohistochemical analysis of the tissue was carried out and the distribution pattern of cytokeratin and vimentin was examined. Gingival explants cultured for 7, 14 and 21 days in serum-free keratinocyte growth medium in perfusion culture were analyzed in the same way. The morphology of

the cultured explant (21 days) was well preserved from stratum basale up to stratum corneum. As proved by immunohistochemical incubation with antibodies to CK 5/6, CK 14 and CK 19, a tissue-specific cytokeratin (CK) expression pattern was maintained during the whole perfusion period. After 7 days of culture vimentin was synthesized in the fibroblast layer and was found in small quantities in each layer of the epithelium. In contrast to conventional cultures, where dissociation of the tissue and a subculture interruption is usually needed for long-term culture, this is not necessary for perfusion cultured tissue. The use of perfusion-cultured gingival explants as autogenous transplants is investigated herein.

Key words

Gingiva · Epithelium · Cell culture · Transplant

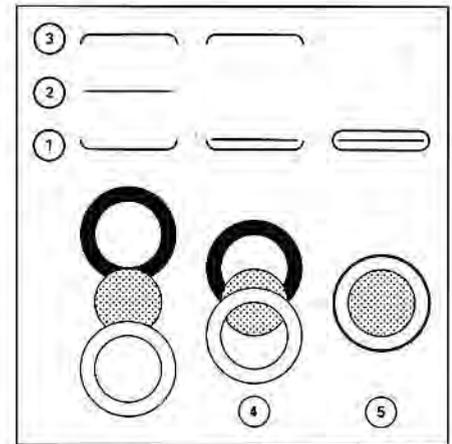


Abb. 1. Ein schwarzer Trägerring (1), ein sog. Sandwich (2), bestehend aus einem Gingivaexplantat zwischen 2 Nylonnetzen, und ein weißer Spannring (3) werden zu einer Zellhalterung montiert, indem das Sandwich auf den Trägerring gelegt (4) und anschließend mit dem Spannring fixiert wird (5)

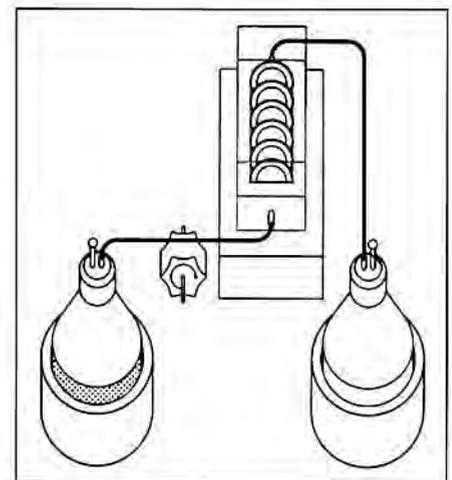


Abb. 2. Perfusionssystem unter einfachen Laborbedingungen: Von der links stehenden Flasche wird frisches Kulturmedium über eine Peristaltikpumpe angesaugt und in die Perfusionkammer gepumpt. Das verbrauchte Medium wird in der Flasche auf der rechten Seite gesammelt

Perfusionskultur

Zum Starten der Perfusionskultur wurden die Gingivaexplantate ohne Disaggregation in speziell konstruierte Zellhalterungen, sog. Minusheets, eingesetzt (Abb. 1): Diese Minusheets bestehen aus 3 Teilen, 1 schwarzen Trägerring (1) und einem weißen Spannring (3). Dazwischen befindet sich ein sog. Sandwich (2), bestehend aus einem Gingivaexplantat, das zwischen 2 Nylonnetze eingelegt wird. Zum Montieren der Zellhalterungen wird das Sandwich auf den Trägerring gelegt (4) und anschließend der Spannring in den Trägerring gedrückt (5).

Um Perfusionskulturbedingungen herzustellen, wurden Perfusionslinien (Minucells und Minutissue, Bad Abbach) zur Aufnahme der Zellträger vorbereitet [7]: Die Perfusionskammern wurden über 2 Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von 1 mm und 4 männliche Luer-Verschlüsse mit den speziellen Schraubverschlässen und den 500-ml-Glasflaschen verbunden (Abb. 2). Nach dem Sterilisieren der Perfusionslinie im Autoklaven erfolgte das Einsetzen der Gewebeträger in die Perfusionskulturcontainer wiederum unter der sterilen Werkbank.

Eine Glasflasche wurde mit Kulturmedium gefüllt. Zur sterilen Ventilation wurde auf jeden Schraubverschluß anschließend ein Sterilfilter montiert. Die Zellhalterungen mit der Gingiva wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette in die Haltevorrichtung der Kammer gestapelt. Anschließend wurde die Kammer mit Kulturmedium befüllt und verschlossen und konnte mit der Flasche aus der sterilen Werkbank entnommen werden.

Zur Perfusion der Kultur mit Medium wurde die Linie an eine langsam laufende Peristaltikpumpe angeschlossen, so daß die Epithelien ständig mit frischem Medium versorgt wurden (Abb. 2). Die Durchflußrate betrug kontinuierlich 1 ml/h. Die Kammern wurden mit einer Wärmeplatte auf 37°C erwärmt und die Mediumvorratsflasche in einer Getränkekuhltruhe auf 4°C temperiert.

Über den Zeitraum von 7, 14 bzw. 21 Tagen wurde die Kultur kontinuierlich mit frischem Kulturmedium versorgt. Zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt wurden die Kammern geöffnet und die Gingiva dem Sandwich für die nachfolgenden Untersuchungen entnommen.

Medien

Keratinozyten-SFM wurde als Standardmedium verwendet, nachdem folgende Substanzen zugesetzt waren: 5 µg epidermaler Wachstumsfaktor (EGF 1–51) und 50 mg Rinderhypophysenextrakt (BPE)(Gibco-BRL-Life Technologies, Eggenstein). Zur Kultur wurde das Standardmedium mit 5 µg/ml Gentamycinsulfat (Gibco-BRL-Life Technologies) versetzt. Kulturmedium, supplementiert mit 2,5 µg/ml Amphotericin B (Fungizone-Lösung, Gibco-BRL-Life Technologies), wurde als Transportmedium verwendet.

Indirekte
Immunfluoreszenzmikroskopie

Gingivaexplantate wurden zum Zeitpunkt der Isolierung und nach 7, 14 und 21 Tagen in Perfusionkultur auf einen Gewebekörper in 1 Tr. Tissue-Tec (Dia Tec, Hallstadt) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden 7 µm dicke Schnitte bei -20°C im Kryostatgerät (Microtom, Heidelberg) angefertigt. An den Explantatschnitten sollten gingivatypische Zytokeratine und Vimentin mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden:

Anti-Zytokeratin 5/6 (Boehringer, Mannheim) wurde in der Verdünnung 1:10, Anti-Zytokeratin 14 (Sigma Chemie, Deisenhofen) in 1:200-, Anti-Zytokeratin 19 (Ks 19.2) [8a] in 1:5- und Anti-Vimentin (Boehringer) in 1:50-Verdünnung eingesetzt. Vor der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Schnitte 10 min lang mit -20°C kaltem absoluten Ethanol (Merck, Darmstadt) fixiert, 3-mal kurz mit PBS gewaschen und 30 min in einer sog. Blockierungslösung [PBS, 1% Rinderserumalbumin, 10% Pferdeserum (Sigma Chemie), pH 7,5] inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte für 90 min mit dem jeweiligen Primärantikörper, gegen die Zytokeratine CK 5/6, CK 14 und CK 19 sowie Vimentin. Die Vorbereitung der Schnitte für die indirekte Immunfluoreszenz erfolgte nach der bereits beschriebenen Methode [3].

Als 2. Antikörper diente für CK 5/6, CK 14 und CK 19 ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter Esel-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg) in der Verdünnung 1:400. Für die mit Anti-Vimentin-Antikörper inkubierten Präparate wurde ein FITC-konjugierter Ziege-Anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper (Sigma Chemie, Deisenhofen) in der Verdünnung 1:300 eingesetzt.

Anschließend wurden die Schnitte mit Testog-FITC-Guard (Testog, Chicago III) auf gereinigten Objektträgern eingedeckelt. Als Negativkontrolle diente je 1 Schnitt, der ohne Primärantikörper inkubiert wurde. Zur fotografischen Dokumentation wurden ein Auflichtfluoreszenzmikroskop (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen) und TriX-Pan-400-SW-Negativfilme (Kodak limited, Hempel Hempstead) verwendet.

Ergebnisse

Im Vordergrund der Experimente stand die Frage, ob nach Perfusionkultur der Gingivaexplantate die Expression gewebetypischer Proteine erhalten blieb. Typisch für die Epithelschichten der Gingiva sind die Zytokeratine CK 5/6, CK 14 und CK 19 [5]. Ergänzend wurde ein Antikörper gegen Vimentin verwendet. Vimentin ist als Marker für bindegewebstypische Zellen bekannt [4]. Damit kann die Dedifferenzierung von Epithelzellen zu mesenchymalen

Zellen, d. h. zu Fibroblasten, untersucht werden.

In immunhistochemischen Experimenten wurde überprüft, welches der Zytokeratine in Gingivaepithelien nach der Perfusionkultur erhalten blieb, welches eine vermehrte oder eine verminderte Expression zeigte und damit die Einleitung einer möglichen Dedifferenzierung des Epithels aufzeigte. Bei der immunhistochemischen Auswertung wurden jeweils die Fibroblastenschicht sowie die basale, suprabasale und luminal Keratinozytenschicht unterschieden. Stratum spinosum und granulosum wurden zur suprabasalen Schicht zusammengefaßt, das Stratum corneum als luminal

Schicht bezeichnet. Das Expressionsmuster für die verschiedenen Zytokeratine und Vimentin wurde je nach Kulturzeit getrennt beurteilt. Die erarbeiteten Werte wurden in einer Übersicht zusammengefaßt (Tabelle 1).

Das CK-5/6-Vorkommen im Gingivaepithel zeigte sich nach mehrwöchiger Perfusionkultur in unterschiedlichem Ausmaß: Im Vergleich zu den Resultaten unmittelbar nach der Isolierung war nach 7 Kulturtagen die CK-5/6-Expression basal und in besonderem Maß suprabasal verringert, während sie luminal verstärkt war. Das CK-5/6-Vorkommen blieb in der basalen und luminalen Zellschicht nach 7, 14 und 21 Tagen Perfusionkultur kon-

Tabelle 1

Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an Gingivaexplantaten in der Übersicht, +++ starke Expression, ++ gute bis geringe Expression, + geringgradige Expression, 0 keine Expression, s singular = Einzelzellen bzw. kleinere Zellgruppen

Zytokeratinnummer [8a]	5/6	14	19	Vim
0-Tage-Kultur				
Fibroblastenschicht	0	0	0	+++
Keratinozytenschicht				
• Basal	+++	+++	+++	+ ^s
• Suprabasal	++	+++	+	+ ^s
• Luminal	++	+++	++	+ ^s
7-Tage-Kultur				
Fibroblastenschicht	0	0	0	++
Keratinozytenschicht				
• Basal	++	++ ^s	++ ^s	+ ^s
• Suprabasal	+ ^s	++ ^s	+ ^s	+ ^s
• Luminal	+++	+++	++	+ ^s
14-Tage-Kultur				
Fibroblastenschicht	0	0	0	++
Keratinozytenschicht				
• Basal	++	++ ^s	++ ^s	++
• Suprabasal	+ ^s	+	+ ^s	+ ^s
• Luminal	+++	+++	++	++
21-Tage-Kultur				
Fibroblastenschicht	0	0	0	++
Keratinozytenschicht				
• Basal	++	++ ^s	++ ^s	+ ^s
• Suprabasal	+	+ ^s	+ ^s	++
• Luminal	+++	+++	++	+ ^s

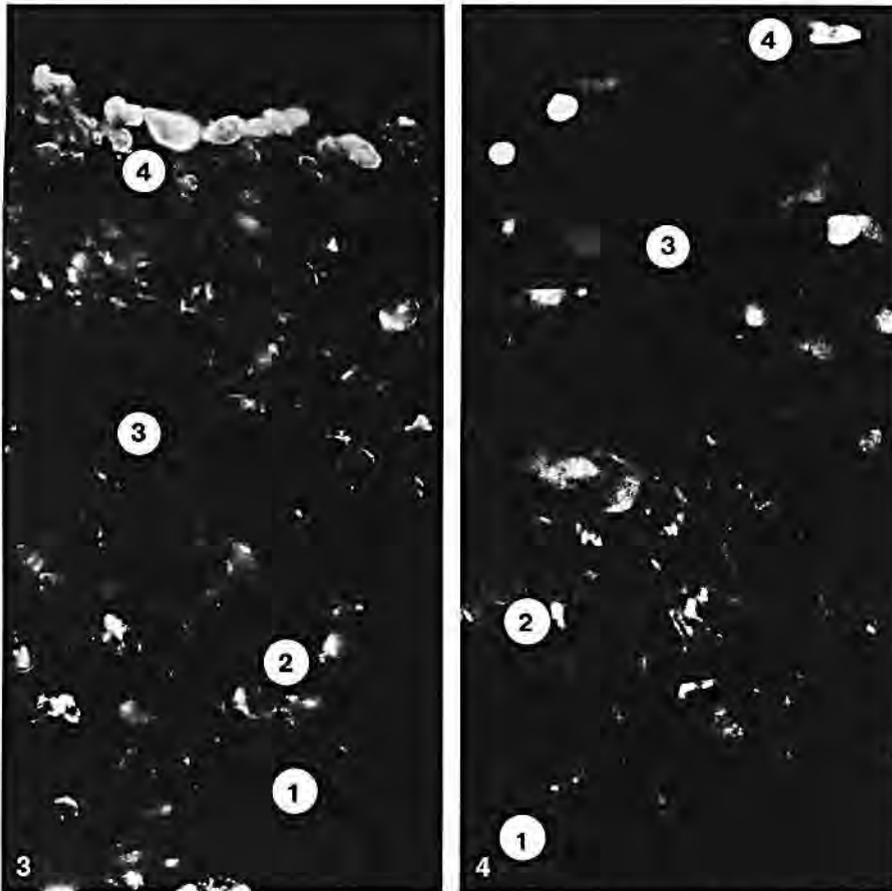


Abb. 3. Zytokeratin-14-Vorkommen in Gingivaexplantaten nach 21tägiger Perfusionskultur, fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Einzelschichten, Vergr. 200:1. Man erkennt die Fibroblastenschicht (1) ohne Zytokeratinvorkommen, die basale Epithelzellschicht (2) mit deutlicher Zytokeratinexpression in kleineren Zellgruppen, die suprabasale Epithelzellschicht (3) mit singular schwacher CK-14-Präsenz sowie die luminal Epithelzellschicht (4) mit starker CK-14-Expression

Abb. 4. Zytokeratin-19-Vorkommen in Gingivaexplantaten nach 21tägiger Perfusionskultur, fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Einzelschichten, Vergr. 200:1. Zu sehen sind die Fibroblastenschicht (1) ohne Zytokeratinvorkommen, die basale Epithelzellschicht mit guter CK-19-Präsenz in Einzelzellen, die suprabasale Epithelzellschicht (3) mit singular schwacher CK-19-Expression sowie die luminal Epithelzellschicht (4) mit deutlichem CK-19-Vorkommen

stant, während in der suprabasalen Schicht bei geringer CK-5/6-Expression häufig nur kleine Zellgruppen festzustellen waren.

Das CK-14-Vorkommen blieb auch nach 21 Tagen Perfusionskultur in den Explantaten luminal noch gleichmäßig stark erhalten (Abb. 3, Tabelle 1). Dagegen ging die CK-14-Präsenz basal und suprabasal nach 7 Tagen in Kultur zurück. Im weiteren Kulturverlauf blieb das CK-14-Vorkommen in der basalen Schicht unverändert gut bestehen (Abb. 3), suprabasal nahm es aber kontinuierlich ab, so daß nach 21 Tagen nur noch eine geringe Expression zu finden war (Abb. 3).

Ebenso wie CK 14 zeigte auch CK 19 luminal nach 21 Tagen ein unverän-

deres Expressionsmuster (Abb. 4). Nach einer Down-Regulierung in der basalen und suprabasalen Schicht in den ersten Tagen blieb die CK-19-Expression fortan in kleinen Zellgruppen basal gut bestehen (Abb. 4), suprabasal blieb nur ein geringgradiges fokales CK-19-Vorkommen erhalten (Abb. 4). Über den gesamten Kulturzeitraum hinweg wurden die Zytokeratine CK 5/6, CK 14 und CK 19 in der Fibroblastenschicht nicht exprimiert (Abb. 3, 4, Tabelle 1).

Das Vimentinvorkommen erwies sich nach Antikörperinkubation in der Fibroblastenschicht bei frisch isolierter Gingiva als ziemlich stark (Tabelle 1). Aber auch nach 21tägiger Perfusionskultur wurde in dieser Schicht ein kon-

tinuierlich gleichmäßiges Vimentinvorkommen festgestellt. In der basalen, suprabasalen und luminalen Keratinozytenschicht zeigte sich nach mehrwöchiger Kultur meist nur eine geringgradige Vimentinexpression in den Einzelzellen. Dagegen war nach 14 Tagen die Vimentinexpression basal und luminal auffallend deutlich. In der suprabasalen Schicht war nach 21 Tagen Kultur ebenfalls eine Vimentinpräsenz festzustellen. Zunächst bleibt ungeklärt, ob es sich bei allen Vimentin-positiven Zellen in den Keratinozytenschichten um eingewanderte Fibroblasten oder um dedifferenzierte Keratinozyten handelt.

Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel, chirurgisch entnommene Gingivaexplantate in Perfusionskultur, d. h. in lebendem Zustand, zu konservieren, um sie für spätere operative Eingriffe in möglichst ursprünglicher Form zur Verfügung zu haben. Dabei soll autogenes Zellmaterial eingesetzt werden, welches dem betroffenen Patienten vor einer geplanten Operation entnommen wird und für denselben Patienten, z. B. unmittelbar nach Entfernung eines Tumors, verwendet werden kann, um größere Flächen chirurgisch abzudecken und narbige Verziehungen zu vermeiden [2].

Bei den bisher üblichen Zellkulturverfahren mußte ein Subkulturverfahren angewendet werden, um die Keratinozyten in Kulturschalen in genügender Menge zu vermehren [1]. Dies führte häufig zum Verlust der Vielschichtigkeit des Epithels und der polaren Differenzierung, somit auch zum Verlust von spezialisierten Funktionen der Zellen innerhalb des Epithels [10].

Dagegen konnte mit Hilfe der Perfusionskulturmethode und unter Verwendung von serumfreiem Medium der mehrschichtige Epithelaufbau in kultivierten Explantaten erhalten werden. Der störende Eingriff der Subkultur in den Zellhaushalt ist – wie sonst bei herkömmlichen Kulturen – nicht erforderlich, da Mediumzufuhr und Metabolitenabtransport sichergestellt sind.

Experimentell soll weiterverfolgt werden, ob mit autogenen Transplanta-

ten aus der Perfusionskultur eine Integration des Explantats im Operationsgebiet erfolgen kann und ob eine Revascularisierung nach der Transplantation stattfindet.

Literatur

1. Green H (1992) Zellkulturen für Transplantate. *Spektrum Wissenschaft* 1:66–73
2. Häring R (1992) *Lehrbuch der Chirurgie: mit Repetitorium*. de Gruyter, Berlin, New York
3. Kloth S, Aigner J, Brandt E, Moll R, Minuth WW (1993) Histochemical markers reveal an unexpected heterogenous composition of the renal embryonic collecting duct epithelium. *Kidney Int* 44:527–536
4. Lombardi T, Samson J, Bernard JP, Di Felice R, Fiore-Donno G, Mühlhauser J, Maggiano N (1992) Comparative immunohistochemical analysis between jaw myxoma and mesenchymal cells of tooth germ. *Pathol Res Pract* 188:141–144
5. Mackenzie IC, Rittman G, Gao Z, Leigh I, Lane EB (1991) Patterns of cytokeratin expression in human gingival epithelia. *J Periodont Res* 26:468–478
6. Minuth WW, Stöckl G, Kloth S, Dermietzel R (1992) Construction of an apparatus for perfusion cell cultures with enables in vitro experiments under organotypic conditions. *Eur J Cell Biol* 57:132–137
7. Minuth WW, Kloth S, Aigner J, Sittinger M, Röckl W (1994) Organ-spezifisches Environment für kultivierte Zellen und Gewebe. *Bioforum* 17:412–416
8. Moll R, Hage C, Thoenes W (1991) Expression of intermediate proteins in fetal and adult human kidney: modulation of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Lab Invest* 65:74–86
- 8a. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalogue of human keratinocytes: pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11–24
9. Oda D, Warson E (1990) Human oral epithelial cell culture. I. Improved conditions for reproducible culture in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 26:589–595
10. Paul J (1979) *Zell- und Gewebekulturen*. de Gruyter, Berlin New York
11. Wille JJ, Månsson-Rahemtulla B, Rahemtulla F (1990) Characterization of human gingival keratinocytes cultured in a serum-free medium. *Arch Oral Biol* 35:967–976