

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für
Experimentelle Ophthalmologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos-

**Der Hornhautslic in-vitro:
Regionale Unterschiede im Wachstum von
kornealen Epithelzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von

Bammel, Mathias

aus Holzminden

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos

2. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. T. Stupp

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für
Experimentelle Ophthalmologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos-
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Thanos
Koreferent: Priv.- Doz. Dr. T. Stupp

Zusammenfassung

Der Hornhautslice in vitro:
Regionale Unterschiede im Wachstum von kornealen Epithelzellen
Mathias Bammel

Das Ziel dieser Untersuchung war die Analyse des Wachstumsverhaltens von peripherem und zentralem Korneagewebe anhand eines in-vitro Scheibchenkulturmodells.

In vielen bisher veröffentlichten Arbeiten stellt die Grundlage - das Vorhandensein von Stammzellen im Limbusbereich der Kornea aller Spezies- zu gleich den verallgemeinernden Rückschluss dar, dass deshalb sowohl die Wachstumspotenz als auch die Wachstumsdynamik von peripherem Korneaepithel immer stärker ausgeprägt sein muss, als dies bei dem zentralen Korneaanteilen der Fall ist.

Die genaue Untersuchung dieser Wachstumsverhältnisse unter dem regulierenden Regime der Stammzellen im Limbusbereich ist immer noch Gegenstand vieler Untersuchungen. Gerade für die Therapie von degenerativen, als auch traumatischen Prozessen im Korneaepithel, stellt die genaue, differenzierte Betrachtung der Geweberegeneration eine große Bedeutung dar.

Das in-vitro Slice- Modell, bei dem Schnitte von zentralen und peripheren Hornhautbereichen unter standardisierten Bedingungen kultiviert wurden, dient als Grundlage dieser vergleichenden Untersuchung.

Eine Foto- Dokumentation und spezielle Vermessung von zentralen und peripheren Ratten und Affenkorneaslices in Abständen von 3 bis 15 Tagen diente der Untersuchung dieser Wachstumsprozesse.

Die anschließende Immunfluoreszenzfärbung zeigte die Zugehörigkeit dieses Gewebes zum Ursprungsmaterial.

Die ermittelten Daten belegen, dass die zentralen Korneabereiche bei der Ratte eine annähernd gleiche Wachstumspotenz und -dynamik aufweisen, wie die peripheren Hornhautareale.

Bei den Affenhornhäuten ist unter den gleichen Kultivierungsbedingungen kein Wachstum, weder bei den zentralen, noch bei den peripheren Hornhautscheiben festzustellen gewesen.

Anhand dieser Ergebnisse muss der Einfluss von Stammzellen oder anderen Einflussfaktoren auf die Wachstumspotenz von kornealem Gewebe differenzierter betrachtet werden, als dies bei früheren Theorien des Zellwachstums der Kornea der Fall war. Das Wachstum scheint bei jeder Spezies unterschiedlich zu sein, womit verallgemeinernde Theorien an Bedeutung verlieren.

Die genaue, individuelle Anpassung von Wachstumsbedingungen an das jeweilige Gewebe ist notwendig und Gegenstand aktueller Forschung, um langfristig die Züchtung von Ersatzgewebe für Hornhautdefekte zu ermöglichen.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2010

Diese Dissertation ist meinen Eltern gewidmet,
die mir alles mit auf den Weg gegeben haben
und meiner Frau, die mich immer von ganzem Herzen
unterstützt.

A. EINLEITUNG	1
1. Anatomie und Funktion der Hornhaut	1
2. Die Physiologie der kornealen Zellerneuerung.....	4
3. Die Bedeutung der Kultivierung von Hornhautgewebe zur Erschließung neuer Therapiemethoden.....	6
4. Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit	7
B. MATERIAL / METHODEN / TECHNIKEN	9
1. Versuchsmaterial.....	9
1.1. Korneas.....	9
2. Gewebekultur.....	9
2.1. Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterial	9
2.2. Geräte	11
2.3. Kornea-Entnahme	12
2.4. Korneapräparation und Slice- Technik	12
3. Immunhistochemische Untersuchungen der Korneaschnitte	15
3.1. Material.....	15
3.1.1. Lösungen und Antikörper	15
3.1.2. Geräte.....	17
3.2. Immunfluoreszenzhistochemie fixierter Gewebe- und Zellkulturen	17
3.2.1. Biologische Grundlagen für die Immunfluoreszenzfärbung	17
3.2.2. Arbeitsabläufe bei der immunhistochemischen Färbung fixierter Gewebekulturen.	18
3.2.3. Vorgehensweise zur quantitativen Erfassung von Korneawachstum.....	19
C. ERGEBNISSE	21
1. Morphologie und Wachstumsverhalten des Korneaepithels.....	21
1.1. Allgemeine Grundlagen des in-vitro- Modells	21
1.2. Wachstum von zentralen und peripheren Korneaslices von Ratten in der Kultur	21
1.3. Wachstum von zentralen und peripheren Korneaslices von Affen (Callithrix jacchus) in der Kultur	27
2. Immunfluoreszenz	29
2.1. Nachweis von Hornhautepithel.....	29
D. DISKUSSION	33
E. ABKÜRZUNGEN:	40
F. LITERATURVERZEICHNIS:	41
G. LEBENS LAUF:.....	44

H. DANKSAGUNG:.....46

I. Anhang

A. Einleitung

1. Anatomie und Funktion der Hornhaut

Die Kornea ist als vorderste optische Struktur des Auges für das Sehen von größter Bedeutung, weshalb sie auch als so genannte „Frontlinse“ bezeichnet wird.

Die unterschiedlichen Brechungsindizes am Übergang von Luft (1,0) zur Hornhaut (1,33) bewirken zusammen mit der uhrglasartigen Wölbung der Kornea deren hohe Brechkraft von 43 dpt, die damit von allen Strukturen des Auges am stärksten zur Brechung des Lichtes beiträgt. Sie besitzt eine nahezu regelmäßige Oberfläche, die neben der Transparenz für die scharfe Abbildung von Gegenständen auf der Netzhaut sorgt. Neben dieser herausragenden Bedeutung für das optische System des Auges stellt die Kornea eine wichtige mechanische Barriere für alle Außeneinflüsse auf das Auge dar, woraus auch ihre schnelle Verletzbarkeit resultiert. Diese Verletzungen, aber auch Entzündungen, angeborene und erworbene Hornhautveränderungen, spielen in der Augenheilkunde eine besondere Rolle. Zur Wiederherstellung werden Eingriffe an der Kornea bis zu Transplantationen, refraktive Eingriffe zur Veränderung der Brechkraft und damit Korrekturen von Fehlsichtigkeiten (insbes. Myopie und Astigmatismus) durchgeführt [12].

Die Hornhaut höherer Vertebraten ist in die Sklera eingelassen und bildet mit ihr zusammen eine fibröse Hülle, die den Augapfel umschließt und auf diese Weise dem Augapfel die Form und die Festigkeit verleiht. Sie grenzt sich zirkulär mit dem Limbus von der Sklera ab und zeigt meist eine horizontal Ellipse mit einem Durchmesser von ca. 11,5 mm, die dazu noch sphärisch gewölbt ist. Der Radius dieser Wölbung beträgt etwa 7,7 mm. Im Zentrum zeigt sich eine geringere Dicke (ca. 0,52-1 mm) als am Rand (0,67- 1,7 mm). Die genauen Maße der Kornea sind besonders für die Ausprägung von Krankheitsbildern der Hornhaut, wie zum Beispiel dem Astigmatismus von Bedeutung [22].

Die Kornea der Ratte ist dagegen weniger als 0,2 mm dick [19].

Der mikroskopische Schichtaufbau der menschlichen Hornhaut zeigt im Meridianschnitt ein nicht keratinisiertes, mehrschichtiges Epithel mit Basalmembran,

die Bowmansche Schicht, das Hornhautstroma, die Descemetische Membran und das einschichtige Endothel (s. Abb. 1).

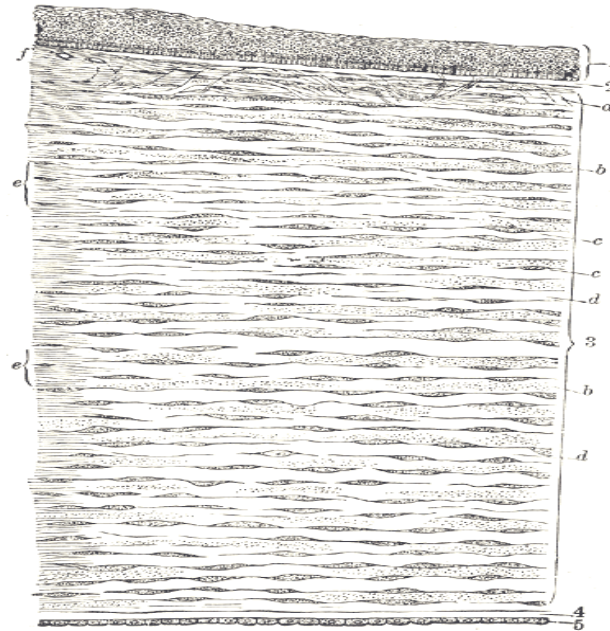


Abb.1: Schichtaufbau der Kornea:

1= Hornhautepithel; 2= Bowman-Membran; 3= Substantia propria cornea (=Stroma); 4= Descemetische Membran; 5= Hornhautendothel

Die äußerste Schicht der Kornea ist mit einem verhornendem Plattenepithel überzogen, welches aus ca. fünf bis sechs Zellschichten besteht [39]. Die Zellen, die der Basalmembran am nächsten aufsitzen, zeigen ein hochprismatisches Bild in der Histologie, die der mittleren Schicht hingegen sind flacher und nach außen konvex geformt. Diese Zellen werden auch Flügelszellen genannt. Die obersten beiden Schichten zeigen stark abgeflachte Plattenepithelzellen.

Eines der wichtigsten Merkmale des Epithels ist die Regenerationsfähigkeit [24], die dadurch garantiert wird, dass sich ein wöchentlicher Generationswechsel der Epithelzellen durch mitotische Zellteilungen der Basalzellen vollzieht [24]. Kommt es zu Zellverlusten oder Defekten der Endothelschicht, so werden diese durch Verdünnung und Ausbreitung der benachbarten Zellen überbrückt [38].

Auf der Basalmembran sitzen basale Epithelzellen, die aus einer Extrazellulärmatrix bestehen. Der Basalmembran folgt die Bowmansche Membran, die als zellfreie, ca. 8 bis 14 µm dicke, veränderte Hornhautstroma-Lamelle ausschließlich aus feinen,

kollagenen Fasern und einer Grundsubstanz besteht [29]. Versuchstiere, wie Kaninchen, Ratten, Mäuse besitzen keine Basalmembran [19]. Ausschließlich Primaten haben diese ausgebildet. Die Basalmembran grenzt an eine bindegewebige Substantia propria an, die aus kreuzweise übereinander geschichteten Lamellen mit Kollagenfibrillen, Keratozyten und Grundsubstanz besteht [35]. Der Hauptanteil der im Stroma vorkommenden Proteine entfällt auf das Kollagen, das bis zu 71 % des Trockengewichtes ausmacht [31]. Die kollagenen Fibrillen sind in Lamellen von ca. 2 µm Dicke angeordnet. Innerhalb dieser Lamellen liegen die Fibrillen parallel und in gleichen Abständen bei gleichem Durchmesser. Diese Regelmäßigkeit ist die wichtigste Voraussetzung für die Transparenz der Hornhaut [27].

Die flachen, länglichen Keratozyten – auch als modifizierte Fibroblasten bekannt - besitzen lange Ausläufer und liegen zwischen den Lamellen des Stromas. Die Grundsubstanz besteht aus Keratosulfat, Chondroitinsulfat und Chondroitin [37]. Zwischen den Lamellen werden wenige wanderungsfähige Zellen (Leukozyten, Plasmazellen, Histozyten) eingelagert [11]. Die „turn- over“ - Rate des Stromas ist sehr niedrig. Innerhalb eines Jahres wird kaum eine Zelle erneuert [15].

Der posteriore Teil der Substantia propria wird von der elastischen Descemetischen Membran eingenommen. Diese trennt die Substantia propria vom einschichtigen Endothel und setzt pathologischen Prozessen einen erheblichen Widerstand entgegen. Im Gegensatz zur Bowmanschen Membran ist sie regenerationsfähig [37].

Das Endothel besteht aus einer einschichtigen Lage abgeplatteter, flacher, kuboidaler Zellen, die durch Zonula occludentes verbunden sind. Es besitzt keine Regenerationsfähigkeit, weshalb Defekte vor allem durch Verdünnung und Ausbreitung von benachbarten Zellen aus überbrückt werden [3]. Mitotische Zellteilungen sind selten. Das Endothel grenzt die Kornea von der vorderen Augenkammer ab. Lateral geht die Kornea in den Limbus über. Der Limbus beschreibt den semitransparenten, vaskularisierten Übergangsbereich zwischen der Bindehaut und der Sklera, auf der einen und der Kornea auf der anderen Seite [33].

Die Korneaoberfläche wird über einen auf dem Epithel liegenden Tränenfilm benetzt. Er stellt einen osmotischen Schutz des Epithels gegen Verdunstung [7] und Austrocknung des Gewebes dar. Das Epithel selbst bildet eine impermeable Schranke

gegen wasserlösliche Agenzien des Tränenfilms und erhält somit die korneale Hydratation aufrecht [10].

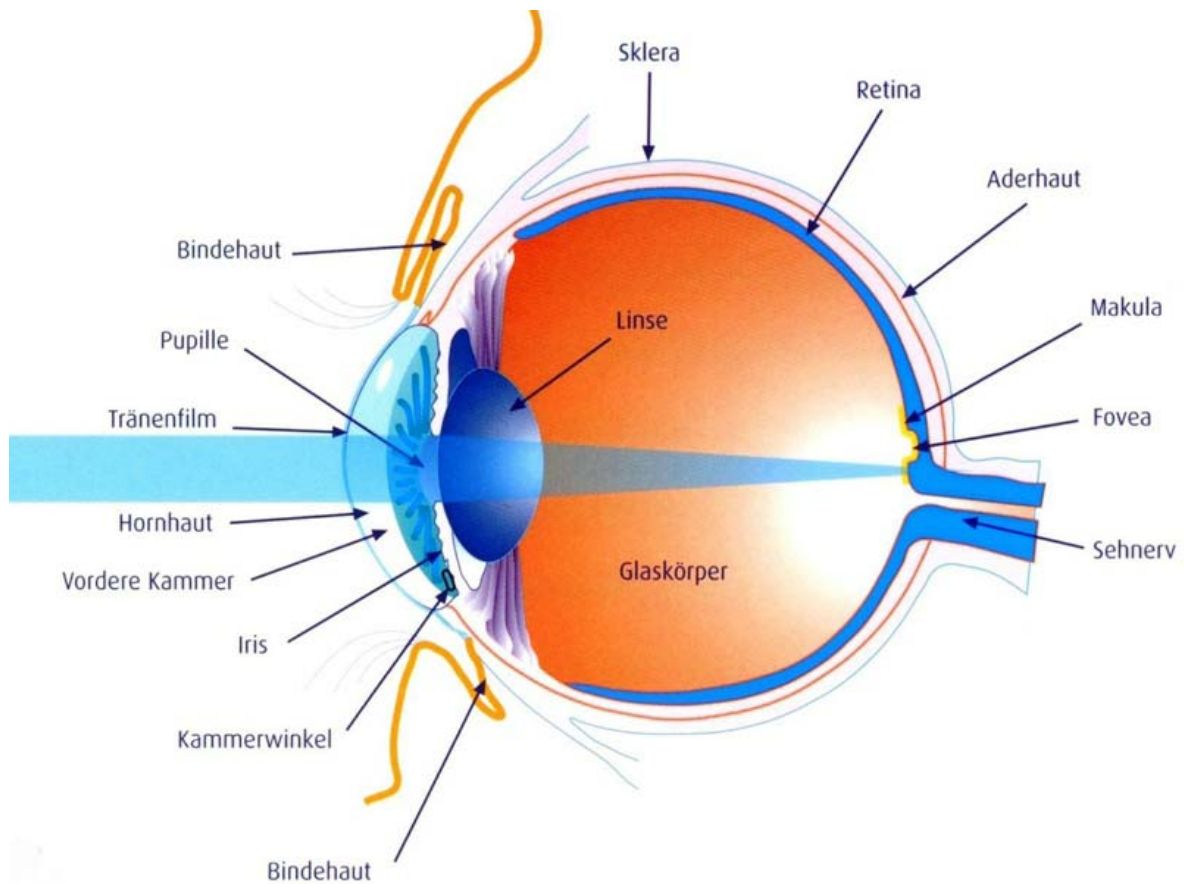


Abb. 2: Querschnitt Auge: Die Hornhaut leistet als sogenannte Frontlinse einen entscheidenden Beitrag zum Schutz und zur Sehkraft des Auges.

2. Die Physiologie der kornealen Zellerneuerung

Die Regeneration des Hornhautepithels vollzieht sich nach einer Schädigung meist innerhalb von einigen Stunden bis Tagen. Es gehört zu den Anteilen der Körperoberfläche, die ständigen Regenerationen unterliegen. Diese vollziehen sich, indem abgeschilferte Zellen der obersten Zellschichten von der Hornhautoberfläche abgestoßen, und fortlaufend in die Tränenflüssigkeit abgegeben werden, während zeitgleich die Zellteilung die Erneuerung gewährleistet. Die Basalzellen des Epithels bauen das mehrschichtige Epithel sehr schnell wieder auf. Bisher wurden mitotische Zellen nur in der untersten Schicht des Hornhautepithels, der Basalschicht,

nachgewiesen, welches der Beweis ist, dass nur diese Zellen die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen [14]. Der Verlust des Kontaktes dieser Zellen zur Basalmembran führt zur Wanderung der Zellen an die obersten Zellschichten, wo sie zu post-mitotischen Zellen werden und ihre Teilungsfähigkeit verlieren [25]. Sind die Zellen der Basalschicht verletzt, erfolgt die Regeneration vom Limbus her, wo nach den neusten Theorien die Stammzellen als Reservoir angesiedelt sind. Die Zerstörung der Stammzellen (z.B. nach Verätzung) führt zu gravierenden Heilungsstörungen mit Überwachsen von Bindehaut auf die Hornhaut [12]. Frühere Theorien beschrieben eine Zellerneuerung sowohl in vertikaler, von den Basalzellschichten des Epithels, als auch in horizontaler durch zentripetal vom Limbus einwachsender Richtung [24].

Weitere Hypothesen, wie die von Thoft and Friend (1983) postulierte X, Y, Z – Hypothese, wurden durch neuere Studien von Schermer et al. (1986) bezweifelt. Somit wich die Theorie einer Umwandlung von Bindehautepithel in Hornhautepithel („konjunktivale Transdifferenzierung“) von Thoft and Friend aus dem Jahre 1983, als Theorie zur Beschreibung des Ursprungs der epithelialen Proliferationszone, einer neuartigen Theorie des Modells kornealer Stammzellen.

Nach Schermer et al. teilen sich diese Stammzellen als Reservezellen der Zellproliferation bei notwendigem Ersatz des Hornhautepithels oder grundsätzlichem Bedarf an Zellerneuerung. Auf diese Weise wird die Anzahl der Zellen konstant gehalten, so dass Zellüberschuss vermieden und Zellverluste ausgeglichen werden. Die Stammzellen entwickeln sich bei der Zellerneuerung zu teilungsfähigen Zellen, die mit ihrer hohen Zelldichte für die Vermehrung der Zellzahl verantwortlich sind. Die Lebensdauer der sich teilenden Zellen ist allerdings begrenzt, wodurch nach einer limitierten Anzahl von Zellteilungen die Zellen als post -mitotische Zellen über den Tränenfilm abgesondert werden [23]. Das Modell von Kruse und Völcker beschreibt das Vorhandensein kornealer Stammzellen ausschließlich im Limbusepithel, wobei die schnell proliferierenden, heilungsfähigen Zellen im basalen Epithel des Limbus und der Hornhaut zu finden sind. Die suprabasalen Schichten von Limbus- und Hornhautepithel beinhalten die Zellen, die diese Fähigkeit zur Zellteilung bereits verloren haben.

Exakte Nachweise über die Existenz limbaler Stammzellen sind immer noch schwierig. Sharma und Colles (1989) bestätigten durch mathematische Analysen, dass Hornhautepithel durch die von Stammzellen ausgehende Proliferation aufrecht erhalten

werden kann und Meller und Kruse zeigten in ihren Arbeiten zur Ex- vivo Expansion kornealer Stammzellen (2001) typische Merkmale bei epithelialisierten Stammzellen, die auf die Identifizierung als Stammzellen hinweisen [33].

Des Weiteren sind viele Fragen im Bereich der Physiologie von Wachstumsvorgängen während der Wundheilung noch nicht vollständig geklärt.

Die wichtige Bedeutung des Limbusbereiches für proliferative und angiostatische Vorgänge stellt dabei eine Grundlage zur weiteren genauen Erforschung der Art und Weise dar, wie die Zellen der Limbusregion regulativ auf die Wachstumsvorgänge des kornealen Epi- und Endothels einwirken.

3. Die Bedeutung der Kultivierung von Hornhautgewebe zur Erschließung neuer Therapiemethoden

Die Therapie der durch vielfältige Ätiologien begründeten Erkrankungen der Hornhaut stellt immer noch eine Herausforderung an die moderne Medizin dar, da die unterschiedlichsten Wachstumsbedingungen und viele noch nicht vollständig aufgedeckte Mechanismen der Zellerneuerung, sowohl im kornealen Endothel als auch im Epithel, sich als äußerst komplex darstellen.

Es entwickelten sich im Laufe der Zeit mindestens genauso viele Therapieansätze, wie Theorien über die genaue Regeneration menschlicher Kornea existieren.

Eine sehr etablierte Methode des Ersatzes degenerativer oder traumatisch verletzter Kornea ist die Hornhauttransplantation, deren Ursprung bereits weit über 103 Jahre zurück liegt.

Allerdings wurde auch früh die enorme Bedeutung der Kultivierung von kornealem Gewebe entdeckt, da dies den Grundbaustein für den Ersatz von menschlichem Hornhautgewebe darstellt. Sowohl die schonende Aufbewahrung in Hornhautbänken, als auch die Züchtung von entnommenem Hornhautgewebe zur autologen oder allogenen Transplantation im Rahmen des modernen „tissue- engineering“ ist nur möglich, wenn die Kultivierungsbedingungen an die Gewebeansprüche best möglich angepasst sind. Auch die durchgeführten Versuche zeigen, dass eine Gewebeat unterschiedlicher Spezies auch unterschiedliche Wachstumsbedingungen benötigt.

Der fortlaufende Rückgang von Spendern für die sowohl perforierende, als auch die seltener durchgeführte laminäre Keratoplastik und die Abstoßungsprobleme nach der Transplantation machen die Entwicklung von Alternativmethoden der Therapie von Hornhautdefekten notwendig. Die Ansätze der aktuellen Forschungsgegenstände sind sehr vielfältig: Beginnend bei Transplantation von peripherem Hornhautgewebe in zentrale Hornhautbereiche, der Züchtung von Stammzellen zwecks Erneuerung verletzter Limbusbereiche oder Züchtung von Ersatzgewebe für zentrale Hornhautdefekte bis hin zur Entwicklung von künstlichen Hornhäuten deren Erprobung 2008 (Frauenhofer Institut 2008) beim Menschen erfolgte, ist das Spektrum sehr groß. Grundlage für diese Forschung stellt immer noch, wie in dieser Arbeit geschehen, die Untersuchung der Wachstumsbedingungen und der genauen Wachstumsprozesse der zentralen und peripheren Abschnitte der Kornea dar.

4. Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden die Aspekte des Wachstums von zentralen und peripheren Hornhautbereichen vergleichend *in vitro* untersucht, um die Hypothese zu überprüfen, dass die peripheren Hornhautareale den zentralen Wachstumsbereichen in der Wachstumspotenz und der Wachstumsgeschwindigkeit überlegen sind.

Das Vorhandensein von Stammzellen in den Limbusbereichen stützt diese Hypothese, auch wenn der exakte Nachweis dieser Zellen sich immer noch als schwierig darstellt. Die Vorgänge für die Zellerneuerung, ausgehend bei den im Limbusepithel vorhandenen Stammzellen, sind spezie- spezifisch unterschiedlich. Dies wurde bereits vielfach sowohl beim kornealen Epi-, als auch Endothel, gezeigt [8].

Um diese große Anzahl von Hornhautgewebe von 19 Ratten und 17 Affen auf ihr unterschiedliches regionales Wachstumsverhalten untersuchen zu können, wurde von unserem Labor ein Scheibchenkulturmodell etabliert, welches es ermöglicht, das *in vitro*- Wachstum und die *in vitro*- Differenzierung des Hornhaut- Epithels zu beobachten [40].

Die Untersuchung erfolgte anhand dieses etablierten *In-vitro*- Slice- Modells [40].

Das Vorgehen umfasste folgende Schritte:

1. In-vitro-Analyse von Morphologie und Wachstumsverhalten von zentralem und peripherem Hornhautepithel mittels fotomikroskopischer Dokumentation und Ermittlung der Wachstumsdynamik der Gewebe in einem standardisierten Zeitverlauf.
2. Die immunfluoreszierende Darstellung zur Ermittlung von Zelltypen, die entweder aus dem Epithel oder aus dem Stroma auswachsen.
3. Der Vergleich der Wachstumsvorgänge innerhalb und zwischen zweier Spezies auch unter Berücksichtigung verschiedener Altersgruppen.

B. Material / Methoden / Techniken

1. Versuchsmaterial

1.1. Korneas

Das für diese Versuchsreihen verwendete Korneagewebe entstammt zu einem Teil von 19 Ratten und zum anderen Teil von 17 Affen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt mehr als 1000 Korneaslices von Ratten und ca. 500 Korneaslices von Affen beobachtet. Zur Fotodokumentation dieser einzelnen Gewebe entstand ein Datenvolumen von ca. 1962 MB.

Die Tiere wurden für andere Zwecke getötet und die Augen aus den Tierkörpern entnommen und zur Verfügung gestellt. In der Regel wurden die Hornhäute innerhalb der ersten Stunde nach der Tötung verwendet.

Bei den Ratten handelte es sich um adulte Ratten der Sprague Dawley- und RCS-Stämme im Alter zwischen 6 und 191 Wochen.

Bei dem untersuchten Affen- Korneagewebe handelt es sich um Kornea von vorher getöteten *Callithrix jacchus* (Weißbüschelaffe). Auch hier waren die Tiere beiderlei Geschlechts, das Alter der Affen lag zwischen 0 und 116 Wochen.

In der Versuchsreihe XI wurde zur vollständigeren Überprüfung des Wachstumsverhaltens P0- Affen (P 0: Am Tag der Geburt getötet) des *Callithrix jacchus* Stammes verwendet. Die Affen stammten aus der Aufzucht des Instituts für Reproduktionsmedizin in Münster, welches der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie die Schädel mit den noch enthaltenen Affenbulbi für experimentelle Arbeiten zur Verfügung stellte.

2. Gewebekultur

2.1. Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterial

Transportmedium:

- HBSS (Hanks Balanced Salt Solution without Ca + Mg with Phenol Red, Endotoxin tested, steril filtered (1x), Firma PAA, Kat.- Nr. 15 -010) Verwendung bei + 4°C

- NaCl	8000 mg/l
- KCL	400 mg/l
- KH ₂ PO ₄	60 mg/l
- Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	48 mg/l
- Glucose	1000 mg/l
- NaHCO ₃	350 mg/l
- Phenolrot	10 mg/l

- Waschmedium: - PBS 0,1M; pH 7,4, without Ca, Mg,
 (Phosphate Buffered Saline), phosphatgepufferte physiologische
 Kochsalzlösung (Firma PAA, Laboratories GmbH Pasching,
 Austria) (Kat. No.: H15- 002)
- 2,04g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) auf 850ml
 Ampuwa.
- 15,13g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) auf 850 ml
 Ampuwa.
- 8g Natriumchlorid (NaCl)
- 0,2g Kaliumchlorid (KCl)

für 0,1 M PBS wurde die Phosphatpuffer- Stammlösung 1: 10 verdünnt
 und dann erst NaCl und KCl hinzugegeben.

- Kulturmedium: - culture medium
- | | |
|-----------------------------|---------|
| w 2,2g/l NaHCO ₃ | F 9016 |
| w L- Glutamin | 854 E |
| w 12,75 mM HEPES | 80ml |
| w Antibiotics | < -20°C |
- (Exp.Sept. 2005)

Nach Zugabe von 10% Fetalem Kälber Serum war das Kulturmedium gebrauchsfähig und konnte bis zu 6 Wochen unter + 4°C gelagert werden.

Substrate zum Beschichten

der Kulturschalen: - Gelatine 0,5% in HBSS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (Sigma)

Puffer: - PBS und -HBSS (wie oben beschrieben).

Fixierungslösung: - 4% Paraformaldehyd (PFA), Fluhn Chemika, in 0,1 M PBS (pH 7,4)

Desinfektionsmittel: - 70% Ethanol Wischdesinfektion in 1000ml Spritzflasche.

Verbrauchsmaterial: - Kanülen - Petrischalen (Falcon, 60mm)
- Skalpelle - Kultivierungsplatte mit 6 Einheiten
- Handschuhe (Cellstar greiner bio- one) TC- Plate 6
- Rasierklinge (Gillette) Well, sterile with lid, single packed
- Pippettenspitze für No.: 657 160
1000µlPipette
- Para- Film- Folie
- Gewebekulturschalen (Cellstar (greiner bio-one), Nocken, Tissuequalität).

2.2. Geräte

- Sterilbank (Biohit- Helios 48)
- Stereomikroskop (Zeiss Stemi 2000 C)
- Kaltlichtlampe (Zeiss KL 1500 electronic Schott)
- Präparationsbesteck (feine Pinzette, Dumont Nr.5; Hornhautpinzette, Mikroschere)
- Brutschrank (Heraeus Instruments Function Line BB 6220, Gaszufuhr von 5,1% Co² bei 37°C)

- Gewebeschopper (Mc Ilwain Tissue Chopper manufactured by The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd. USA)
- Kameramikroskop (Zeiss Axiovert 135) mit Digitalkamera (Nikon Coolpix 4500) und Monitor (Sony Trinitron)
- Kühlschrank (Bosch)
- Tiefkühlschrank (Bosch economic super)
- 1000µl Pipette (Eppendorf Reference 1000)
- Zwei Bechergläser, steril 250ml,
- Spritzflasche
- Schott Messzylinder

2.3. Kornea-Entnahme

Der Tod der Ratten wurde mit Kohlendioxidinhalation herbeigeführt. Nach Feststellung des Todes (fehlende Atemexkursion, Herzstillstand, Reflexausfall) wurden die Augen unter sterilen Bedingungen enukleiert, indem die sechs äußeren Augenmuskeln und der Nervus opticus durchtrennt wurden.

Die Entnahme der Affenkornea beinhaltete die knöcherne Präparation der Orbita des angelieferten Affenschädels, sowie ebenfalls die anschließende E nukleation der Bulbi über die Durchtrennung der sechs äußeren Augenmuskeln und des Nervus opticus.

Der Transport sowie das Waschen der Bulbi wurde in PBS (Phosphate Buffered Saline) durchgeführt.

2.4. Korneapräparation und Slice- Technik

Die weiteren Präparationsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Laminar- Flow) vollzogen.

Das Präparationsbesteck musste vorher genauso wie Klinge, Arbeitsfläche der Sterilbank und Arbeitsfläche des Gewebhackers mit 70%- igem Ethanol desinfiziert werden.

Die enukleierten Bulbi lagen in einer Petrischale mit HBSS und PBS.

Unter dem Stereomikroskop mit einer Pinzette fixiert, erfolgte die Inzision mit einer Skalpellspitze durch die Sklera im Bereich des Limbus. Nach dem Einstich wurde von dieser Stelle aus mit einer Mikroschere ein zirkumferentieller Schnitt geführt, so dass die Kornea vom Bulbus gelöst werden konnte. Im Anschluss war die abgelöste Kornea erneut mit einer Pinzette fixiert, damit eine Inzision ca. 2 mm vom äußeren Limbus-Kornea-Rand erfolgte und somit ein zweiter zirkumferentieller Schnitt um das Zentrum der Hornhaut die Kornea in einen peripheren äußeren und einen zentralen inneren Abschnitt aufgeteilt hatte.

Die zentralen Hornhautabschnitte konnten als erstes auf die Arbeitsfläche des Gewebhackers gelegt werden, wobei das Gewebe leicht mit Medium angefeuchtet eine optimale Adhäsion während des Schneidvorgangs erreichte. Mit dem Hacker wurde die Hornhaut dann in 20 Streifen mit einer Breite von jeweils 180 Mikrometer horizontal geschnitten. Das geschnittene Gewebe wurde unter dem Mikroskop in einer mit HBSS und PBS gefüllten Petrischale vorsichtig voneinander getrennt.

Als nachfolgender Schritt konnte mit dem Schneiden der peripheren Hornhautanteile begonnen werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Arbeitsfläche vorher gründlich von allen Gewebestücken der zentralen Hornhaut gesäubert wurde, damit keine peripheren und zentralen Slices miteinander vermischt waren.

Nach dem Erstellen der peripheren Gewebestücke sind auch diese streng getrennt in einer weiteren Petrischale in HBSS aufbewahrt worden.

Als Zwischenschritt wurden die vor fünf Stunden mit jeweils 2 ml (pro Kultivierungsplatteneinheit) HBSS und 0,5g Gelatine beschichteten Petripermschalen mit HBSS erneut gespült.

Die Petripermschalen waren in dem Zeitraum nach der HBSS/Gelatine-Beschichtung bereits im Brutschrank bei 37°C und 5,1% CO² angewärmt worden.

Nach dem Spülen der Kultivierungsplatteneinheiten sind die jeweiligen Gewebeschnitte unter mikroskopischer Sicht vorsichtig auf die Platten überführt und ausgerichtet worden, so dass die streng getrennten Gewebebereiche (peripher/zentral) in ihren bezeichneten Einheiten auf dem Boden der Platten zu sehen waren. Es waren fünf bis acht Slices pro Schale angeordnet. Außerdem wurde darauf geachtet, ganze Kulturplatten mit nur einem Gewebebereich - entweder zentral oder peripher - zu erstellen.

Die so platzierten Gewebestücke trockneten 5 min. an, bis unter dem Mikroskop nur noch ein geringer Flüssigkeitssaum um den Slice zu sehen war. Jetzt wurden die Schnitte vorsichtig mit insgesamt 2 ml Kulturmedium betropft, damit eine möglichst optimale Adhäsion des Gewebes an den Untergrund gewährleistet werden konnte. Das Kulturmedium war in dem Brutschrank eine halbe Stunde bei 37°C und 5,1% CO² angewärmt worden.

Der Brutschrank wurde im Anschluss mit den Kultivierungsplatten und den darauf befindlichen Explantaten bestückt, womit nun die Inkubation der Korneaslices für 14 bis 15 Tage bei 37°C unter 5% CO² begann.

Die Kultivierung der Gewebsschnitte beinhaltete einen Wechsel des Kulturmediums, der alle zwei bis drei Tage vorgenommen worden war.

Die stetigen Wachstumskontrollen der Gewebe unter dem Mikroskop erfolgten im Abstand von 3 Tagen.

Nach Ablauf der 14 bis 15 Tage waren die Korneaslices mit 4% Paraformaldehydlösung (1 ml pro Kultivierungseinheit) für 1h fixiert und im Anschluss mit PBS Lösung im Kühlschrank bei 4°C für weitere Versuche aufbewahrt worden.

3. Immunhistochemische Untersuchungen der Korneaschnitte

3.1. Material

3.1.1. Lösungen und Antikörper

- Lösungen:**
- PBS (s. 2.1.)
 - Paraformaldehyd (PFA, s. 2.1)
 - FKS 10%: Fetales Kälberserum (Seromed) hitzeinaktiviert und verdünnt in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} .

Antikörper:

- Primäre Antikörper:**
1. Anti- Keratin (pan) (Abcam limited: Mouse monoclonal (80) to (Verdünnung auf 6ml Pan Keratin, Product No.: ab 8068); Verdünnung: 1: 50 FCS)
 2. Collagen I (SIGMA: Monoclonal Anti- Collagen Type I, Clone Col-1 Mouse Ascites Fluid Product No. C 2456); Verdünnung: 1: 2000
 3. Collagen III (Sigma: Monoclonal Anti-Collagen Type III, Clone FH- 7A, Mouse Ascites Fluid Product No. C 7805); Verdünnung. 1: 2000
 4. Collage IV (SIGMA: Monoclonal Anti-Collagen Type IV, Clone COL- 94, Mouse Ascites Fluid Product No. C 1926); Verdünnung 1:1000
 5. Collagen VI (Chemicon: Mouse Anti- Human Collagen Type VI, Monoclonal Antibody Catalog No. MAB 1342); Verdünnung: 1: 1000
 6. Connexin 26 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.: Connexin 26, N-19, Product No.: sc- 7261); Verdünnung: 1: 500
 7. Connexin 43 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.: Connexin 43(C- 20), Product No.: sc- 6560) Verdünnung: 1: 500

8. Chondroitinsulfat (Fitzgerald Industries International: Monoclonal Antibody Data Sheet, Chondroitinsulfate Mab Host: Mouse, Clone: 9.2.27, Subclass: IgG 2a, Catalog No.: RDI- CHONDabm- 27, Verdünnung. 1: 100)
9. Decorin (USBiological: Sheep anti- Human Decorin (Proteoglycan II) 36- 49, Catalog No.: D 1875)
10. Fibronectin (SIGMA: Anti- Human Fibronectin, Developed in Rabbit, Affinity Isolated Antibody, Product No. F 3648)

Sekundäre Antikörper:

1. Cy 2 Antimouse (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Cy 2- conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Code Number 115- 226-062); Verdünnung: 1:200
2. Cy 2 Anti goat (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Cy 2- conjugated AffiniPure Donkey Anti- Goat IgG (H+L), Code Number: 705- 225-003); Verdünnung: 1: 200
3. TRITC (SIGMA: Anti- Rabbit IgG (Whole Molecule) TRITC Conjugate, Affinity isolated Antigen Specific Antibody ,Antibody Adsorbed with Human IgG, Product No.: T 6778); Verdünnung: 1: 400
4. TRITC (SIGMA: Anti- Mouse IgG (Fab SPECIFIC) TRITC Conjugate, Affinity Isolated Antigen Specific Antibody Adsorbed with Bovine, Horse and Human Serum Proteins, Product No.: T 7782); Verdünnung: 1:300
5. FITC Anti sheep (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (H+L), Code Number: 713-095- 147); Verdünnung: 1: 200

3.1.2. Geräte

Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop:

„Axiovert 35“, (ZEISS) plus Fluoreszenzfilter 450- 490nm und 510- 560 nm
Okular mit 30- fache Vergrößerung.

Kamera:

„AxioCam“ (ZEISS), Benutzung der Objektive:

Zeiss Neonflux 5x/0,15 (rot) 440320 Neonfluor für die Hauptübersicht,

Zeiss LD Achrop 20x/0,40 (grün) für die Feinübersicht,

Digitalkamera: Nikon Coolpix E 4500

Quecksilberdampfampe:

XBO 75 Watt;

HBO 100 Watt

Computergestütztes Bildanalysesystem:

Software: „AxioVision“ 4.5 (ZEISS),

„Axio Vision LE 4,5“ (ZEISS) als frei verfügbares Download der Firma
Carl Zeiss, Jena.

3.2. Immunfluoreszenzhistochemie fixierter Gewebe- und Zellkulturen

3.2.1. Biologische Grundlagen für die Immunfluoreszenzfärbung.

Für eine genauere Lokalisation und Identifizierung von Hornhautepithel wurde eine zweischrittige Färbemethode (= indirekte Immunfluoreszenz) angewendet, bei der ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen bindet, und anschließend ein zweiter farbstoffmarkierter Antikörper, der gegen das FC- Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, hinzugegeben wird.

Durch diese Abfolge der Arbeitsschritte wird einerseits mehr Flexibilität erreicht, als bei der direkten Methode, da eine gewisse Anzahl von Primärantikörpern aus einer Spezies mit den gleichen markierten Zweitantikörpern verbunden werden können, andererseits ist diese Methode auch um ein Vielfaches empfindlicher, da mehrere Zweitantikörper mit den unterschiedlichen Epitopen des Primärantikörpers reagieren.

Wichtig bei dieser Färbemethode ist die optimale Antikörperverdünnung vor der Anwendung der jeweiligen Primärantikörper, da so Nebenreaktionen vermieden werden und eine starke spezifische Anfärbung mit minimaler Hintergrundfärbung entsteht. Nicht erwünschte Nebenreaktionen treten vor allem dann auf, wenn sekundäre Antikörper mit endogenen Immunglobulinen der Probe kreuzreagieren.

3.2.2. Arbeitsabläufe bei der immunhistochemischen Färbung fixierter Gewebekulturen.

Die immunhistochemische Färbung fixierter Gewebekulturen ist in zwei Abschnitte aufzuteilen, die an zwei getrennten Tagen durchgeführt wurden.

Der erste Tag begann mit der Entnahme der Kultivierungsschalen aus dem Kühlschrank, in denen die Korneaschnitte in farbloser PBS Lösung bei ca. 4°C aufbewahrt wurden. Sie waren bereits vor der Lagerung in PBS Lösung mit 4% PFA fixiert worden.

Der Puffer musste zunächst abpipettiert werden, so dass die Gewebeslices in drei Durchgängen zu je 20 min mit PBS (2 ml pro Einheit) gewaschen werden konnten. Das Waschen fand bei diesen Kulturen vorsichtig nur durch das Auf- und Abpipettieren von PBS-Lösung statt.

Nach dem Waschvorgang wurden die Kulturen für zehn Minuten in -20°C kaltem Methanol im Kühlschrank fixiert. An den Fixierungsvorgang, der dem Aufbrechen von Lipidmembranen diente, schloss sich erneutes dreimaliges Waschen zu je fünf Minuten mit 2 ml PBS pro Kultivierungsplatteneinheit an. Um unspezifische Bindungsstellen blockieren zu können erfolgte die Zugabe von je 1 ml FCS (Fetales Kälberserum), in dem die Gewebestrukturen mindestens eine halbe Stunde liegen mussten. Innerhalb dieser Zeit konnte bereits mit der exakten Verdünnung der Primärantikörper mit 10% FCS begonnen werden, wobei die Verdünnungsvorgaben der Produktinformation des

jeweiligen Antikörpers entnommen werden konnten (jeweilige Verdünnung: Siehe oben!).

Der Erstantikörper, der nach dem Zeitraum des Blockens und nach abpipettieren des 10% FCS auf die Gewebekulturen gegeben wurde, musste für mindestens zwei bis drei Stunden oder über Nacht auf dem Korneagewebe im Kühlschrank bei 4°C inkubiert werden.

In den Versuchsreihen dieser experimentellen Arbeit ist der Erstantikörper immer über Nacht und der Zweitantikörper über mindestens vier Stunden auf dem Gewebe im Kühlschrank verblieben.

Am zweiten Tag ist der Erstantikörper durch dreimaliges Waschen von jeweils fünf Minuten entfernt worden. Nun schloss sich eine Inkubation mit dem Zweitantikörper für drei bis vier Stunden unter Lichtausschluss an, da ein vorzeitiges Ausbleichen des jetzt sehr lichtempfindlichen Gewebes durch UV- Licht verhindert werden musste.

Aus diesem Grund war der vorsichtige Umgang mit allen fluoreszenzfarbstoff-enthaltenden Behältnissen wichtig.

Um die Immunfluoreszenzfärbung der Gewebe abzuschließen wurde der überschüssige, zweite Antikörper in fünf Waschdurchgängen zu je sieben Minuten entfernt und die Slices in Dapi- Moviol Lösung eingebettet.

Die so vor dem Austrocknen geschützten Gewebeschnitte konnten nun mit Deckgläsern versehen und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Diese Vorgehensweise wurde unabhängig von der Spezies oder dem Antikörper bei allen kornealen Gewebeschnitten durchgeführt. Die Gewebeschnitte waren so für zwei bis drei Wochen im Kühlschrank unter 4°C und Lichtabschluss aufbewahrt worden.

3.2.3. Vorgehensweise zur quantitativen Erfassung von Korneawachstum

Die quantitative Erfassung des Korneawachstums in- vitro wurde mittels einer speziellen Software (Zeiss, Axio Vision) durchgeführt, die neben der nativen Darstellung der Korneaslices auch die Vermessung des Ursprungs- und des neu gewachsenen Gewebes zuließ. Das jeweilige Gewebestück der Kornea wurde nach dem vorgegebenen zeitlichen Verlauf (3, 6, 9, 12 Tagen) im Vergleich zum Ursprungsgewebe gemessen. Die Bedingungen für die Anwendung der Axio Vision

Software bei der Vermessung des Korneagewebes setzte die vorherige Fotodokumentation jedes einzelnen Korneaslices voraus.

Zur Fotodokumentation wurden die in den Petripermschalen gewachsenen Gewebestücke mit der gesamten Schale unter das Objektiv einer Zeiss Axiocam Kamera gelegt und der jeweilige Slice mit einer 5x Vergrößerung zur Grobübersicht und 20x Vergrößerung zur Feinübersicht fotografiert. Durch vorsichtigen Umgang mit dem in den Petripermschalen gewachsenen Gewebe, das sehr empfindlich auf Stöße und Vibrationen reagiert, wurde die Ablösung der neu entstandenen Zellen von dem Ursprungsgewebe verhindert.

Auf diese Weise war einerseits das Ursprungsgewebe, als auch das jeweilig neu gewachsene Gewebe in seiner festen Größe vermessen worden.

Da das neu entstandene Korneaepithel in seiner Zelldichte noch deutlich dünner war, war optisch eine klare Abhebung zum Ursprungsgewebe der Slices erkennbar.

Eine optische Unterscheidung des Ursprungs- vom neu hinzugekommenen Gewebe ist somit eindeutig möglich gewesen.

Der Wert der gemessenen Fläche zeigt, in welchem Umfang das Wachstum der Korneaslices stattgefunden hatte. Die Zunahme der Gesamtfläche (in μm^2) diente als Wachstumsnachweis, wobei die Subtraktion der Ursprungsfläche von der Gesamtfläche den Wert der neu hinzu gewachsenen Gewebefläche darstellt.

Die Fotodokumentation der Affenkorneaslices wurde identisch zu der der Rattenkornea durchgeführt.

C. Ergebnisse

1. Morphologie und Wachstumsverhalten des Korneaepithels

1.1. Allgemeine Grundlagen des in-vitro- Modells

Die Unterschiede im regionalen Wachstumsverhalten waren nicht nur im Bezug zu der Spezies (Affe/ Ratte) zu sehen, sondern es galt besondere Aufmerksamkeit auf den Vergleich zwischen dem Korneaepithel aus den zentralen Hornhautabschnitten –auf Höhe der Pupille- und den peripheren Korneaabschnitten – ca. 0,3-0,5 mm vom Limbus entfernt zu richten.

Die Breite der jeweilig rechteckigen bis teils quadratischen Korneaslices betrug ca. 100- 190 μm .

1.2. Wachstum von zentralen und peripheren Korneaslices von Ratten in der Kultur

Die Epithelfront dieser Korneaexplantate begann nach 12 h relativ gleichmäßig auszuwachsen, wobei das Wachstum in den freien Raum der Petripermschale, als auch über den eigentlichen Korneaslice hinweg, stattfand. Die Wachstumsgeschwindigkeit zeigt eine Linearität.

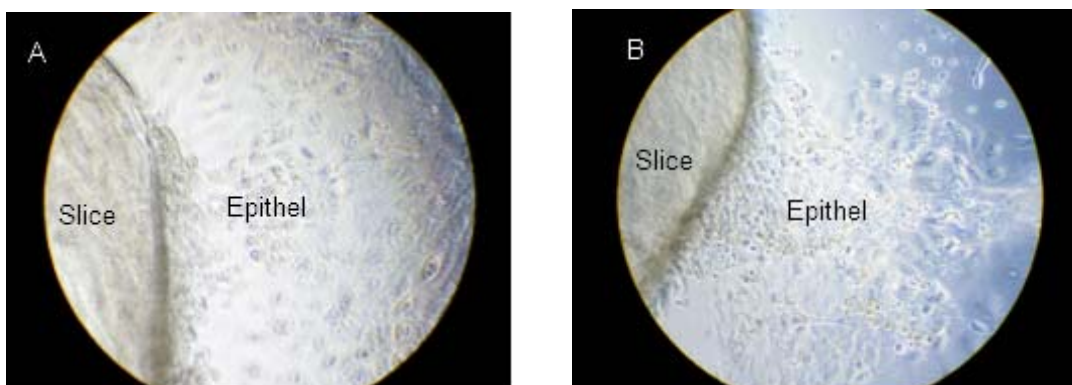


Abb. 3.: Ausgewachsenes Korneaepithel der Ratte nach ca. 24 Stunden:

- Migration von zentralen Epithelzellen vom Slice links ausgehend nach rechts.
- Migration von peripheren Korneaepithelzellen ebenfalls vom Ursprungsslice links nach rechts auswachsend.

Die Zellzahl nahm mit Beginn der Kultivierung von Tag zu Tag deutlich zu, wobei sich die Epithelzellen kreisförmig um das Korneascheibchen formierten, bis nach drei Tagen bereits ein konfluenter, relativ dichter Zellrasen zu erkennen war (Abb. 4 a) und b)).

Die Anordnung der Zellen dieses Zellrasens war so zu beschreiben, dass die Epithelzellen, die dem Explantat am nächsten lagen mehrere Zellschichten bildeten, wohingegen die nach außen (vom Slice am weitesten entfernt gelegenen Zellen) gerichteten Zellen in ihrer Dichte und Anzahl deutlich geringer waren. Die Schichtung der Zellschichten war in der äußersten Schicht sehr dünn bis nur einlagig ausgeprägt. Der auswachsende Zellrasen behielt bei allen Explantaten durchgehenden Kontakt zum Ursprungsgewebe.

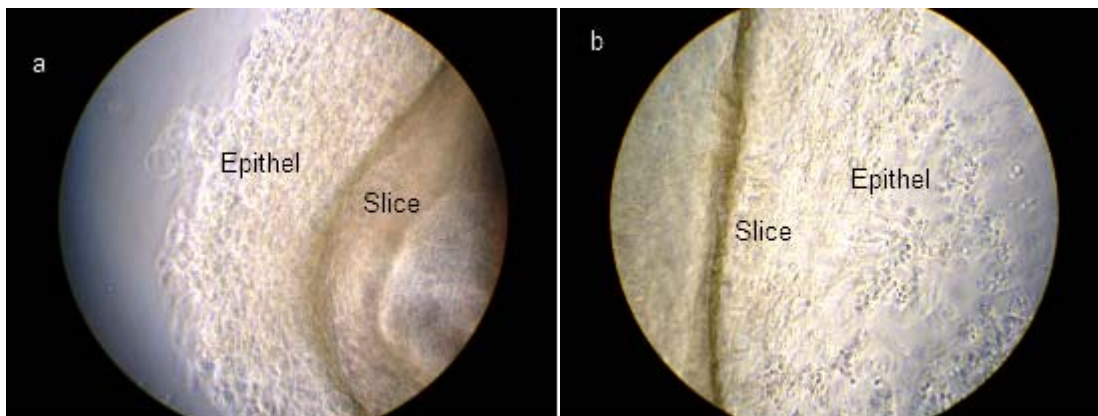


Abb. 4: Korneaepithelzellen der Ratte nach 3 Tagen mit bereits deutlich dichterem Zellrasen (bei ebenfalls 20 x Vergrößerung):

- a): Peripheres Korneaexplantat mit nach links vermehrtem Epithelzellrasen.
- b): Zentrales Korneaexplantat mit Vermehrung der bestehenden Epithelzellen nach rechts.

Die auswachsenden Zellen hatten direkten Kontakt mit dem Boden der Petripermschalen. Einzeln betrachtet, zeigten die Korneaepithelzellen eine polyedrische Form. Die Zellen des Korneaepithels hatten, ähnlich der in-situ Situation, Kontakt zu fünf bis sechs umgebenden Zellen gleichen Typs und gleicher Struktur.

Eine Veränderung der Morphologie mit zunehmender Kultivierungsdauer war dahingehend zu beobachten, dass die Kontinuität des Kornearasens bei den Rattenhornhautscheiben unterbrochen war. Der epitheliale Monolayer war nur noch am

peripheren Rand vollständig erhalten und ein verstärktes Auswachsen von spindelförmigen Fibroblasten war zu erkennen (Abb.: 5).



Abb. 5: Peripheres Korneaexplantat vom Affen nach 15 Tagen (20x Vergrößerung): Außer einer vermuteten Fibroblastenkontamination ist kein Anhalt für ein Wachstum von Korneaepithelzellen sichtbar. Die Ränder der Slices waren im gesamten Zeitraum relativ scharf abgegrenzt.

Die Beobachtungen zum Größenwachstum von Gewebeabschnitten aus der Peripherie bzw. Zentrum von Rattenkornea erfolgte in fünf Versuchsreihen mit insgesamt 27 Rattenbulbi mit einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen pro Versuchsreihe.

Es wurden die ersten beiden Kulturen in ihrem Gesamtwachstum nach 14 Tagen im Mikroskop beobachtet, photographisch dokumentiert und gemessen, um in den ersten Experimenten grundsätzliche Nachweise von Wachstum führen zu können.

Die weiteren drei Versuchsreihen wurden in Abschnitten von jeweils drei Tagen mittels Phasenkontrastmikroskopie beobachtet, digitalfotografisch dokumentiert und mittels computergestütztem Bildauswertungssystem Axio-Vision vermessen. Dies geschah bei jeder Versuchsreihe, die jeweils aus vier Petripermschalen (zwei periphere und zwei zentrale) bestanden, wobei eine Petripermschale in sechs Untersuchungskammern unterteilt war. Pro Versuchsreihe wurden zwei bis vier Rattenbulbi präpariert.

Innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraumes zeigten sowohl die peripheren, als auch die zentralen Korneabereiche der Rattenhornhäute mit fortschreitender Kultivierungsdauer eine kontinuierliche, annähernd lineare Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit.

Nach drei Tagen betrug so die Gesamtfläche der peripheren Korneaabschnitte $2,5 \text{ mm}^2$, nach sechs Tagen $3,7 \text{ mm}^2$, nach neun Tagen $5,9 \text{ mm}^2$ und nach 12 Tagen $9,5 \text{ mm}^2$.

Die Wachstumsfläche der zentralen Hornhautbereiche waren mit $22,5 \text{ mm}^2$ nach drei Tagen, 32 mm^2 nach sechs, 54 mm^2 nach neun und 93 mm^2 nach 12 Tagen sehr ähnlich im Verlauf. Der 15 Tag dient als Kontrolltag, um eine weitere Wachstumstendenz über den angegebenen Zeitraum hinaus zu überprüfen.

Als Ergebnis lassen sich nur geringfügige Unterschiede im Wachstumsverlauf der peripheren und zentralen Korneaabschnitte feststellen.

Beiden Bereichen kann die oben in Zahlen bezifferte, relativ gleiche, lineare Wachstumsgeschwindigkeit zugeschrieben werden. Damit besitzen die vermessenen Korneagewebe in diesem Zeitraum eine annähernd gleiche Wachstumspotenz.

Als Wachstum ist der Gewebezuwachs in μm^2 pro Tag hier definiert.

Die Wachstumspotenz ist die Fähigkeit Wachstum in der vorgegebenen Zeiteinheit entwickeln zu können.

In vorherigen Arbeiten wurde festgestellt [33], dass ein Quotient zwischen Ursprungsgröße und Wachstumsfläche keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse erbrachte.

Alle so ermittelten Werte zeigten diesbezüglich auch unter Berücksichtigung der Ursprungsgröße einen für das Wachstumsverhältnis identischen Verlauf.

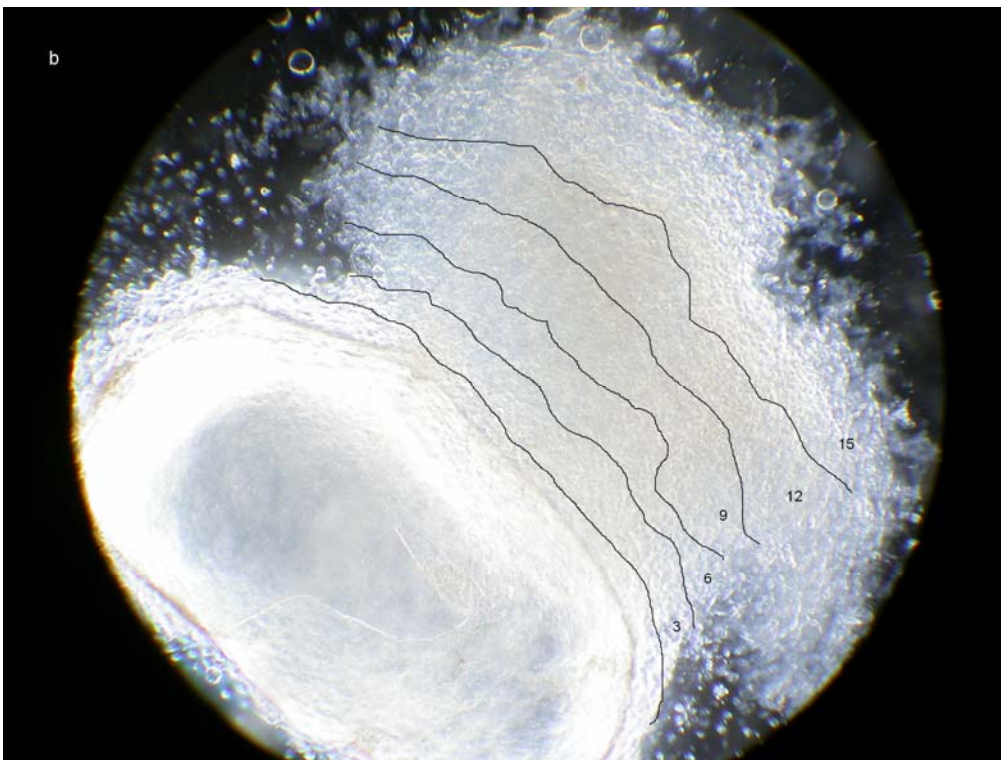
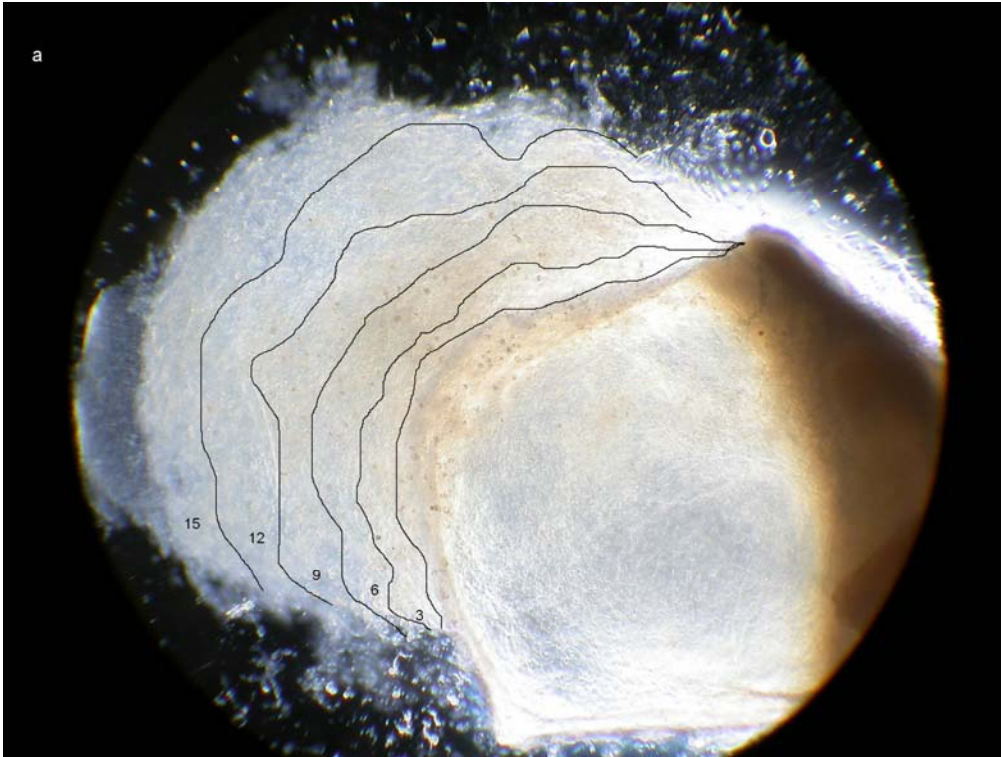


Abb. 6: Zeitlicher Wachstumsverlauf der Korneaslices der Ratte (1-15 Tag) mit annähernd identischem linearem Wachstum (20x Vergrößerung):

- a) Peripherer Korneaslice mit nach links ausgewachsenem dichtem Zellrasen.
- b) Zentraler Korneaslice mit ebenso ausgewachsenem Epithelzellrasen.

Aufgrund einer möglichst reellen Darstellung wurden im Verlauf der Arbeit die Werte als absolute Größen in dem Histogramm gezeigt.

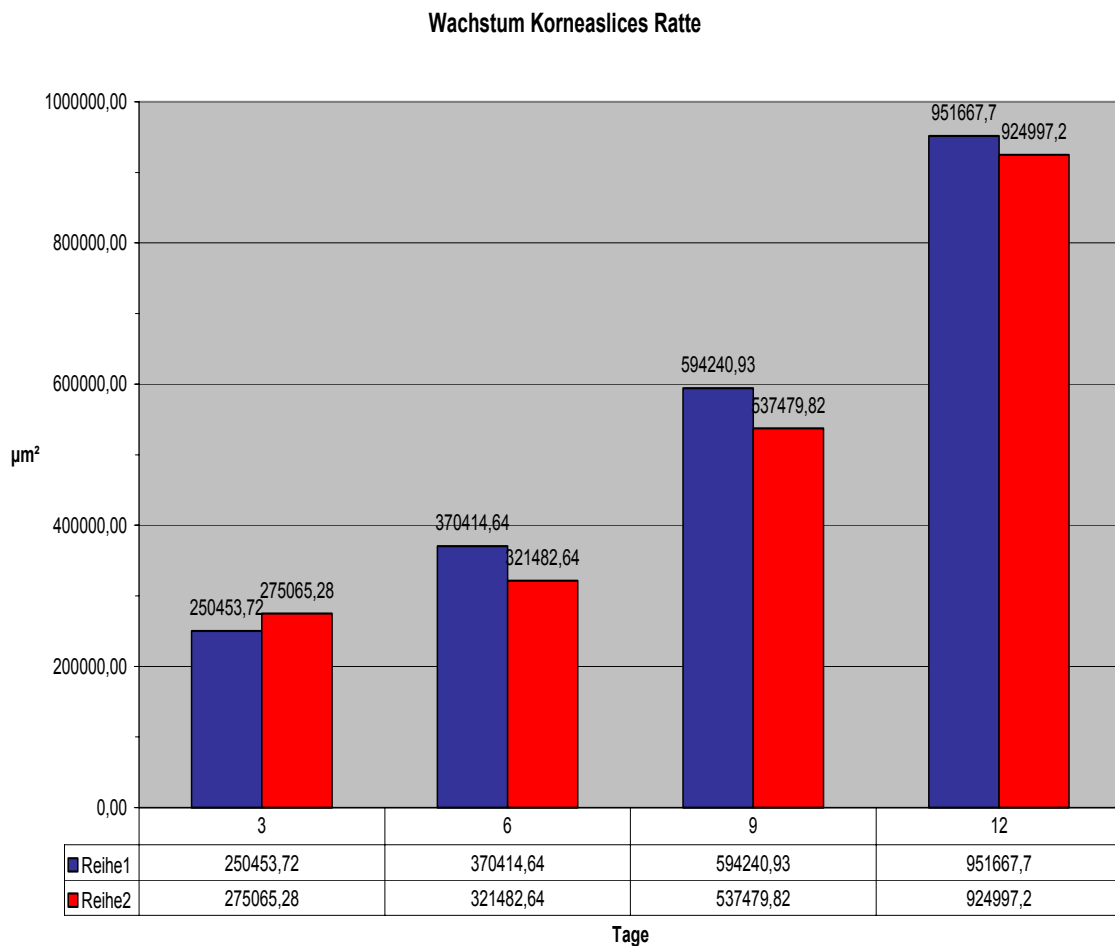


Tabelle 1.:Vergleichende graphische Darstellung des Wachstumsverlaufes der Korneaslices der Ratten bis zum Tag 12:

Reihe 1 (blau): Wachstumszunahme der peripheren Hornhautslices mit annähernd gleicher Wachstumstendenz wie die

Rot (Reihe 2): Zentralen Korneaschnitte. Die Zahlen geben die Gesamtgröße der neu zum Ursprungsslice gewachsenen Fläche in μm^2 wieder.

1.3. Wachstum von zentralen und peripheren Korneaslices von Affen (*Callithrix jacchus*) in der Kultur

Das Wachstumsverhalten der Epithelzellen der Kornea von Weißbüschelaffen wurde in sechs Versuchsreihen mit insgesamt 37 Augen von *Callithrix jacchus* durchgeführt, wobei ca. 185 Hornhautslices angefertigt worden waren, die zur Beobachtung standen.

Die Schnitte der ersten beiden Versuchsreihen waren 14 Tage lang kultiviert worden und wurden danach mit der Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes untersucht.

Bei den weiteren vier Versuchsreihen erfolgte nach Zeitabständen von jeweils drei Tagen eine mikroskopische Beobachtung einschließlich Fotodokumentation und computergestützter Messtechnik (Zeiss- Axiovision), welche insgesamt kein nennenswertes Wachstum der Affenkorneaschnitte feststellen konnte.

Auch eine weitere Kultivierung über einen Zeitraum von 14 Tagen hinaus erbrachte keine weiteren sichtbaren Wachstumszeichen dieser Gewebe.

Lediglich eine Zunahme der Fibroblastenzellen –wie in Abb. 5 gezeigt wird - stellt sich mit längerer Kultivierungszeit dar, welches aber keinerlei Auswirkungen auf Wachstumsverhalten des Epithelgewebes zeigte.

Keine Fotoserie aus der erstellten Fotobank mit ca. 850 Bildern ließ somit einen eindeutigen Wachstumsnachweis zu, wie es bei der Kultivierungsreihe der Rattenkorneae der Fall gewesen war.

In allen Bildserien dieser Arbeit fanden kontinuierliche, computergestützte Messungen und Beobachtungen statt, die bei allen Versuchsreihen möglichst standardisiert worden waren.

Die Kultivierungsbedingungen, als auch die Erstellung der Hornhautschnitte, wurden ebenso genau gleich zu den Methoden der Rattenkorneakulturen durchgeführt.

Größenunterschiede, die sich aufgrund der Schnitttechniken und der damit im Zusammenhang stehenden Herkunft aus Peripherie oder Zentrum ergaben wurden berücksichtigt.

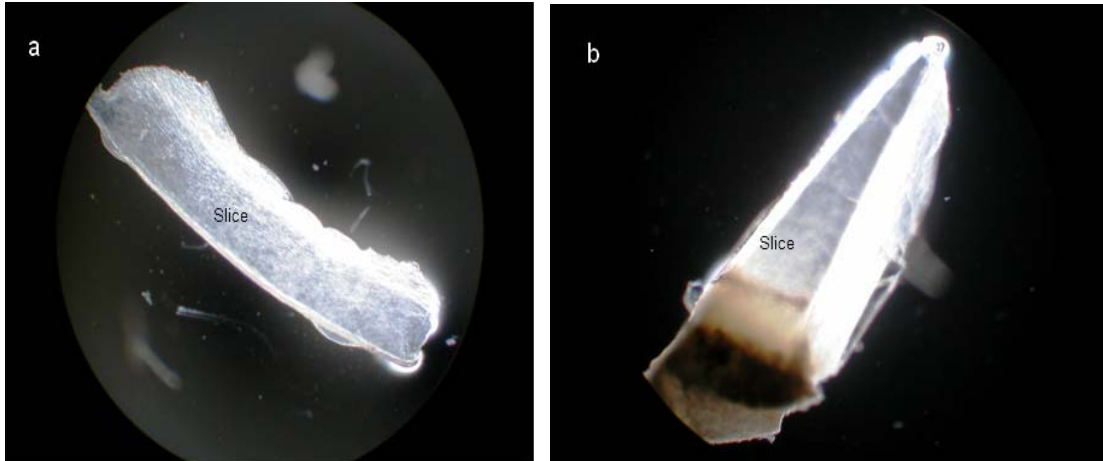


Abb 7: Korneaslices von *Callithrix jacchus* (Weißbüschelaffe) nach drei Tagen Kultivierung. Diese Slices stehen stellvertretend für alle Hornhautslices der Affenkulturen. Bei keinem Korneaschnitt war Wachstum von Epithel zu sehen. Abbildung a) zeigt einen zentralen Korneaslice, bei dem der Ursprungsslice eindeutig abgrenzbar ist genauso wie in Abbildung b) sich der periphere Korneaschnitt ohne Wachstum darstellt. Bei der bräunliche Struktur am unteren Rand des Slices b) handelt es sich um einen Anschnitt von Regenbogenhaut.

2. Immunfluoreszenz

2.1. Nachweis von Hornhautepithel

Die Immunfluoreszenzfärbung des kultivierten Korneagewebes erbringt im Rahmen dieser Arbeit die Grundlage für den Nachweis von Wachstum des jeweilig spezifischen Hornhautepithels. Somit lässt sich in dem ausgewachsenen Gewebe nach Auswahl des zugehörigen Antikörpers, spezifisch das Zellwachstum des Ursprungsgewebes nachweisen. Außerdem wird auf diese Weise dargestellt, dass jedes gewachsene Korneaepithel vom Ursprungsepithel aus gewachsen und diesem Hornhautepithel zugehörig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sind zehn hornhautspezifische Antikörper verwendet worden, die jeweils eine im Hornhautepithel vorhandene Strukturkomponente (bzw. deren Zellen) sichtbar machen kann.

Die hier gezeigten Bilder sind exemplarisch für eine Reihe von ca. 30 verschiedenen Immunfluoreszenzbildern. Die Abbildungen 8. und 9. zeigen jeweils exemplarisch das Ursprungsgewebe und Zellen von ausgewachsenem Hornhautgewebe angefärbt, durch für Korneagewebe charakteristische Antikörper (hier: Chondroitinsulfat, Collagen IV und Connexin 43).

Diese Aufnahmen zeigen durch ihre Anfärbung die Zugehörigkeit des neu gewachsenen Gewebes zu seinem Ursprungsgewebe. In den Abbildungen 10. und 11. sind diese Zugehörigkeiten auch zu sehen, wobei lediglich das Ursprungsgewebe streng markiert angefärbt ist, da dort kein Wachstum stattgefunden hat. Die in Abbildung 10. b) einzeln dargestellten versprengt angefärbten Zellen sind einige wenige Ursprungszellen, ohne -wie in dem phasenkontrastmikroskopischen Bild zu sehenden- zu zu ordnenden neu entstandenem Gewebe.

Abbildung 8 bis 11 zeigen exemplarisch eine Methode, die es erlaubte zwei korneaspezifische Antikörper für die Färbung eines Slice anzuwenden. Dies ermöglichte einen sparsameren Gebrauch dieser sehr teuren Substanzen.

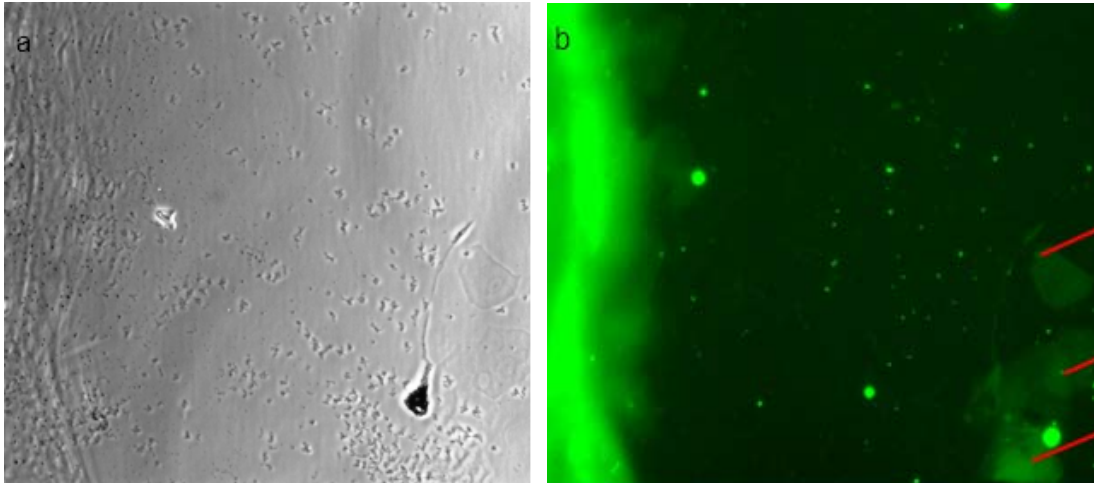


Abb. 8: a) und b): Darstellung von Chondroitinsulfat in der Rattenkornea in vitro:

- a) Phasenkontrastaufnahme zeigt links den Slice und nach rechts die ausgewanderten Zellen.
- b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des gleichen Präparates zeigt bei einigen Zellen (rote Pfeile) und im Slice eine deutliche Anfärbung, 15 Tage nach Kultivierung (20 fache Vergrößerung).

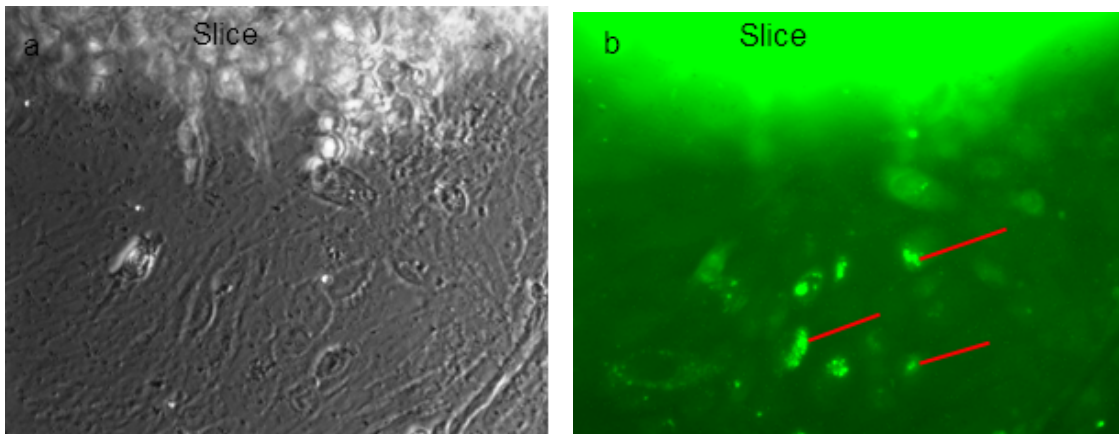


Abb. 9 : Collagen IV + Connexin 43 bei einem Korneaslices der Ratte peripher nach 15 Tagen Wachstum. In Abbildung a) ist der Ursprungsslice mit ausgewachsenen Epithelzellen nach unten zu sehen, wobei in Abbildung b) in der Fluoreszenzaufnahme einzelne Zellen (Pfeile) zu sehen sind, die eindeutig dem Ursprungsgewebe zugehörig sind.

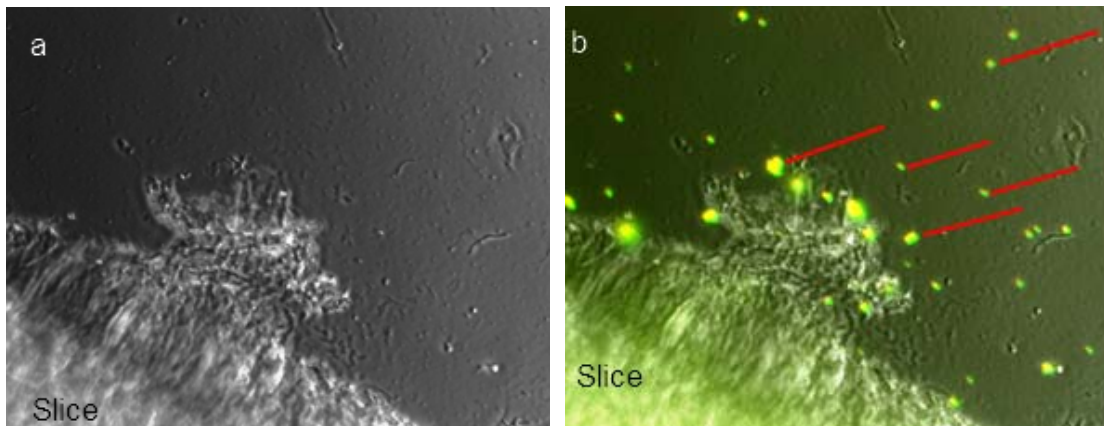


Abb. 10: Collagen IV und Connexin 43 bei Affenkorneaslices nach 15 Tagen Wachstum. a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von ohne einen Nachweis von gewachsenem Epithel. b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit vereinzelt Zellen (rote Pfeile), die aber keinem zusammenhängendem Zellrasen zuzuordnen sind.

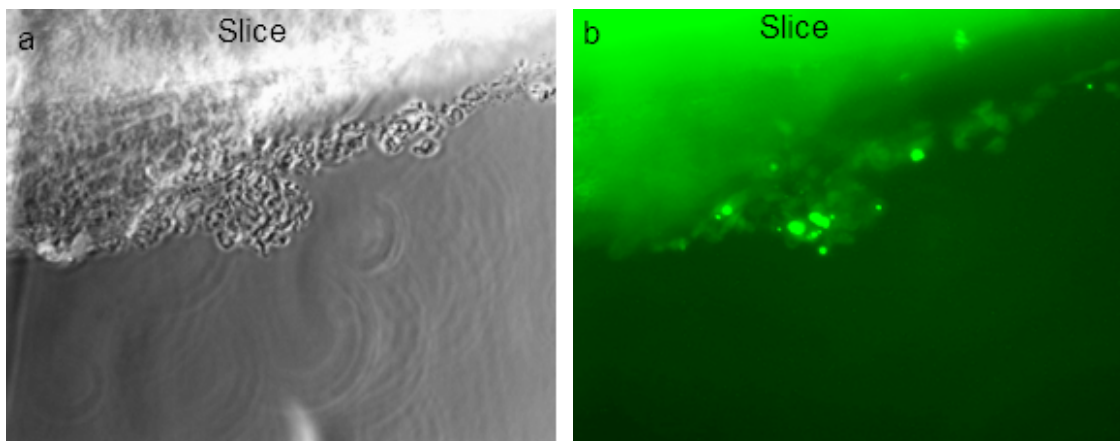


Abb. 11: Peripherer Korneaslice vom Affen nach 15 Tagen Kultivierung in der a) Phasenkontrastmikroskopie und b) Fluoreszenzmikroskopie mit Collagen IV und Connexin 43. Der Ursprungsslice ist ohne nachweislichem Wachstum deutlich zu erkennen, da auch die im Randbereich angesiedelten Zellen in Abbildung b) in dem Ursprungsgewebe verblieben sind und sich außerhalb des Gewebes keine ausgewachsene Zelle befand, die sich fluoreszenzmikroskopisch zeigt.

Die immunhistochemische Anfärbung dieser relativ großen Gewebestücke ist sehr aufwendig, da durch die Dicke der Slices eine größere Menge von Antikörpern verwendet werden muss, als dies bei der Anfärbung von dünneren mikroskopischen Schnitten der Fall ist. Trotz der Einhaltung der jeweiligen Verdünnungsstufen kann es zu einem Überstrahlen des Ursprungsgewebes im Vergleich zum neu gewachsenen Gewebe kommen.

D. Diskussion

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens von kornealem Gewebe aus peripheren und zentralen Hornhautbereichen muss Spezies spezifisch betrachtet werden, da sich gezeigt hat, dass viele Unterschiede zwischen tierischer und menschlicher Kornea im Bezug auf ihre Wachstumspotenz zu berücksichtigen sind [2].

So zeigten schon Ebato et al. (1987) ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zwischen zentralen und peripheren Anteilen menschlicher Kornea, jedoch konnten durch die Ermittlungen der normierten Werte diese Wachstumsunterschiede in verwendeten Slice- Modellen mit Rattenkornea nicht immer bestätigt werden [33].

Unter Berücksichtigung der Ausgangslänge hatten dort die Slices, unabhängig von ihrer Herkunft aus Peripherie oder Zentrum, ein annähernd identisches Wachstumsverhalten.

Die morphologischen Studien und Wachstumsbeobachtungen des Hornhaut- Slices stellen ein biologisch aktives und stabiles System dar, welches vielfältige Aspekte der in- vivo Situation berücksichtigt, aber doch von vielen Einflussfaktoren abhängig ist [4].

Bedeutend erscheint in diesem Zusammenhang die Gestaltung und Verbesserung der Kulturbedingungen. Beispiel für eine deutliche Verbesserung der Kulturbedingungen für Hornhautgewebe ist die besonders sorgfältige Wahl des Kulturmediums und auch die Kultivierung auf gelatinebeschichteten Petripermschalen.

Das Kultivierungssystem des Hornhaut- Slice in- vitro, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, ermöglicht es Wachstumsprozesse des Hornhaut- Epithels allein, als auch Interaktionen mit Endothelzellen zu untersuchen.

Die Kultivierung des Hornhaut- Slice in- vitro, als organtypisch aufgebautes Scheibenkulturmodell, berücksichtigt die gesamte Hornhaut mit ihren drei Schichten und stellt somit ein physiologisch zusammenhängendes Gewebe dar. Hierbei wächst das Hornhaut- Epithel als konfluente Schicht in- vitro aus und kann auf diese Weise großflächig als zusammenhängendes Syncytium untersucht werden. Darin liegt auch der Vorteil gegenüber dissoziierten Zellkulturen (Hainsworth, 1991; Anderson et al., 1993; Kahn et al., 1993) [13] [21], die eine Unterbrechung von Zellkontakten zwischen den einzelnen Schichten der Kornea bewirken.

Im Allgemeinen können viele Faktoren diskutiert werden, die Einfluss auf das Wachstum in der Hornhaut haben können.

Dies beginnt bei der Wahl der Spezies, dessen Hornhaut im in- vitro- Slice Modell kultiviert werden soll. So war im Verlauf dieser Arbeit zu sehen, dass Rattenkornea auch bei weniger anspruchsvollen Kultivierungsbedingungen ein besseres Wachstum zeigte, als dies bei der Hornhaut von Affen der Fall war. Bei dieser Erkenntnis muss hinterfragt werden, ob das hier angewandte Modell der Kultivierung von Kornea Slices bei Ratten auch ein Verfahren darstellt, welches es ebenfalls ermöglicht Hornhäute höher entwickelter Spezies, wie von Affen, erfolgreich kultivieren zu können. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass der Aufbau von Ratten und Affen Kornea ähnlich ist. Unterschiede sollten aber Beachtung finden. Dies beginnt bei den verschiedenen Größenabmessungen der Kornea und geht bis zu anatomischen Unterschieden, die zum Beispiel darin liegen, dass ausschließlich Primaten eine Basalmembran besitzen, wohingegen sie bei Versuchstieren wie Kaninchen, Ratten oder Mäusen fehlen [19].

Wenn die Theorie weiterhin Bestand hat, dass das Wachstum und die Regeneration verletzter Korneaareale von der Peripherie aus geht -da dort Stammzellen für eine schnellere Zellerneuerung verantwortlich sind- so ist zu überlegen, ob dabei sowohl die Unterschiede, als auch die daraus resultierenden Anforderungen an ihre Kultivierungsbedingungen eine Rolle für das Wachstum von Kornea in- vitro spielt [36].

Außerhalb dieser reinen morphologischen Unterschiede ist bisher immer noch nicht eindeutig geklärt, wodurch sich dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten bei den Spezies und bei peripheren und zentralen Kornearegionen erklären lassen. Diese Grundlagen stellen aber gerade bei der Wahl therapeutischer Methoden zur RepARATION von Hornhautdefekten eine wesentliche Rolle dar [5].

Eine der therapeutischen Optionen ist, neben der Transplantation kompletter Hornhäute, die Transplantation von isolierten und in- vitro kultivierten Epithel- oder Endothelzellen. Das humane korneale Endothel ist in vivo nur eingeschränkt teilungsfähig und geschädigtes Endothel kann bisher nur durch die Transplantation einer Spenderhornhaut ersetzt werden. Daher gilt seit Jahren ein besonderes Interesse der Transplantation von kultivierten kornealen Endothelzellen auf Hornhäute mit anschließenden Regenerations- und Funktionsstudien in vivo und in-vitro. Die Mehrheit dieser Arbeiten verwendeten für diese Untersuchungen vor allem Hornhäute von Spezies (z.B. Kaninchen) bei denen Proliferationsvorgänge nach Verletzungen bereits

natürlicherweise vorkommen [8]. Im Tiermodell mit Kaninchen oder Primaten konnte gezeigt werden, dass endothelzelltransplantierte Hornhäute nach Keratoplastik normale Funktionen übernahmen und die Hornhäute transparent blieben.

Bei humanem Gewebe wurde speziell für die Transplantation von Endothelzellen die Erhöhung der Endothelzellendichte durch das Einfügen der Zellen in den bestehenden Endothelverband von Hornhäuten experimentell mit bisher weniger Erfolg versucht. Verwendungen fanden vor allem fetale Zellen oder Primärkulturen. Die Schwierigkeiten lagen darin, menschliche korneale Endothelzellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und über mehrere Passagen zu vermehren.

Wenig Informationen gibt es über das Verhalten und die Funktion von menschlichen Zellen nach derartigen Transplantationen, wobei nach Aussage der Meisten diese Transplantate versagten [8].

Probleme bei der Kultivierung von menschlicher Hornhaut bereitet vor allem langfristiges Wachstum dieser Endothelzellen zu erreichen. Humane korneale Zellen des Endothels konnten nur dann über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, wenn sie aus embryonalem Gewebe oder von jungen Spendern isoliert wurden [9] [16] [17] [1]. Probleme entstanden außerdem bei kornealen Endothelzellen von Hornhäuten älterer Spender, die entweder nicht wuchsen oder sehr schnell Zeichen der Zellalterung zeigten [30] [32]. Diese Schwierigkeiten der Kultivierung von Endothelzellen lassen sich auch auf die Epithelzellen übertragen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse gehen mit vielen bereits anerkannten wissenschaftlichen Erkenntnissen überein, dass es zwischen dem Wachstum der zentralen und der peripheren Korneaareale bei der Ratte keine signifikanten Wachstumsunterschiede gibt, bei gleichen Wachstumsbedingungen. Dabei hat die Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen, dass es sich hierbei um authentisches Korneaepithel handelt.

Es konnten in dieser Arbeit aber Unterschiede zwischen Hornhautepithelwachstum und Endothelwachstum aufgezeigt werden.

Das Hornhautepithel unterliegt, so wie die anderen großen Körperoberflächen, großen Zellerneuerungsraten. Die Zellen der Basalschicht bieten die Fähigkeit zur Zellteilung [14]. Der Abbruch des Kontaktes zur Basalmembran hat auch den Verlust der Zellteilung zur Folge, so dass die obersten Zellschichten zu post-mitotischen Zellen

werden [25]. Dies zeigt, dass nur die Zellen der Basalschicht die Fähigkeit zur Zellteilung haben [14], aber sich die Zellerneuerung sowohl in vertikaler als auch in horizontaler durch zentripetal vom Limbus einwachsende Zellen vollzieht [24]. Daraus entstand die X-Y-Z –Hypothese von Thoft and Friend (1983), die beinhaltet, dass zur Erreichung eines Zellgleichgewichtes die Proliferation der Basalzellen (X) plus der Proliferation der Limbuszellen (Y) den Zellverlust (Z) der Hornhautoberfläche ausgleichen. Auf diese Weise wird alle sechs bis zehn Tage das Korneaepithel erneuert. Diesem Modell gegenüber steht das neuere Modell von Schermer et al., welches von der Existenz kornealen Stammzellen ausgeht [34], die als Reservezellen zur Zellproliferation bei Notwendigkeit der Zellerneuerung zur Verfügung stehen und so Zellverluste ausgleichen, aber Zellüberschuss vermeiden. Diese Stammzellen befinden sich nach Schermer et al. ausschließlich im basalen Limbusepithel und kommen weder in zentralen noch im peripheren Hornhautepithel vor. Der Nachweis dieser im Limbusepithel existierenden Stammzellen fehlt noch, auch wenn eine mathematische Analyse der Zellwanderungsbewegungen und der zellulären Proliferation bestätigte, dass das Hornhautepithel durch die von den Stammzellen ausgehende Proliferation aufrecht erhalten werden kann [36].

In gleicher Art deuteten die Ergebnisse für die Regenerationsvorgänge von Korneaendothel in der Arbeit von Engelmann et al. [8] auf die Bedeutung der Limbusregion und ihre regulierende Funktionen auf die Regeneration des Endothels hin. Allerdings ist die Regenerationsfähigkeit des Korneaendothels sehr schlecht und Defekte können nur durch Verdünnung und Ausbreitung der benachbarten Zellen [3] repariert werden, weshalb hier das besondere Interesse auf der Endothelzelltransplantation mit in- vitro Kultivierung des humanen Korneaendothels liegt. Da intaktes korneales Endothel durch Wachstumsfaktoren wenig beeinflusst wird, oder nur geringfügig durch Zusätze der Nährmedien [26], könnte die Qualität des Endothels durch Endothelzelltransplantation verbessert werden.

Es erschienen aber auch bei den mit dieser Arbeit vergleichbaren Experimenten von Bednarz et al. [2] regionale Unterschiede in dem Wachstumsverhalten von Endothelzellen. Während dort vom Zentrum der Hornhaut isolierte Endothelzellen kaum Mitosen zeigten, proliferierten die vom Rand der Hornhaut isolierten Zellen. Auch weitere Versuchsreihen mit auf Substrathornhäuten transplantierten

Endothelzellen, die zeigen sollten, wie sich unterschiedliche Endothelzell- Populationen nach einer Zelltransplantation auf der extrazellulären Matrix von Hornhäuten verhielten und ob ein unterschiedliches Proliferationsverhalten zu beobachten war, hatten ein eindeutiges Ergebnis: Die auf der extrazellulären Matrix ausgebreiteten zentralen Endothelzellen proliferierten kaum, wo hingegen bei den peripheren Zellen nach Transplantation abgerundete Zellformen zu erkennen waren, die auf Zellteilung hinwiesen [2].

Diese vielen Hinweise auf ein unterschiedliches Wachstumsverhalten, sowohl bei peripheren, als auch zentralen kornealen Epithel- als auch Endothelzellen- führen zu vielen Rückschlüssen. Es gibt eindeutige Hinweise darauf, dass die Limbusregion mit ihren dort befindlichen Stammzellen sowohl beim Epithel, als auch beim kornealen Endothel regulierende und damit wachstumsproliferierende Impulse geben kann [6].

Um aber den Rückschluss zu zu lassen, dass periphere Korneaareale eindeutig stärkeres Wachstum zeigen, als zentrale Bereiche, muss eine differenziertere Betrachtungsweise durch die Ergebnisse dieser und weiterer Arbeiten geschehen. Diese Betrachtung führt wieder zu den Spezies spezifischen Unterschieden wie sie bei den Wachstumsbedingungen von kornealem Endothelzellen [18] [20] [28] bereits nachgewiesen wurden.

Der Anteil der Untersuchungen mit kornealen Epithelzellen ist deutlich geringer. Trotzdem kann festgestellt werden, dass bei höher entwickelte Spezies andere Wachstumsvorgänge beobachtet werden und dabei auch andere Wachstumsbedingungen notwendig scheinen [2].

Diese Versuchsdurchführung ist für periphere als auch zentrale korneale Epithelzellen der Ratte ausreichend und erzeugt gute Wachstumsproliferation, aber für korneales Gewebe von Primaten ist dies wiederum nicht der Fall.

Insgesamt ist zum unterschiedlichen Wachstum von Ratten und Affenkornea in der Kultur zu sagen, dass die Beobachtungen bei den Korneaslices abhängig von der Spezies (Affe oder Ratte) aber unabhängig von Herkunftsort (aus zentralen oder peripheren Korneaabschnitten) zu treffen waren. Dies bedeutet, dass die Wachstumsgeschwindigkeit bei dem jeweiligen Individuum als relativ einheitlich zu sehen ist, die Spezies im Vergleich untereinander aber sehr unterschiedlich sind, was

sich darin ausdrückte, dass die Rattenkornea sehr stark, die Affenkorneaexplantate (Abb. 7, 10 und 11) gar nicht in dieser Kultur wuchsen.

Lediglich ein Auswuchs von spindelförmigen Fibroblasten ist bei beiden Gewebeexplantaten von Affen und Ratten zu beobachten (Abb. 5).

Das initiale Auswachsen von Rattenkornea war bereits nach durchschnittlich 12 h zu sehen. Dies stellte sich in Form von Proliferation distal gelegener Hornhaut- Zellen dar, so dass eine neue Zellschicht von polygonal angeordneten Zellen sichtbar wurde, die traubenförmig auswuchs.

Die Wachstumsrichtung dieses proliferierenden Epithels zeigte sich primär vom Slice weg, wobei später auch über das Stroma in Richtung Endothel ein Auswachsen zu sehen war.

In der Zeit stärkerer Zunahme der Zellschichten war eine Ausbreitung der Hornhautzellen auf dem Boden der Petripermschalen zu erkennen, welche nach 2-3 Tagen eine geschlossene, ellipsoid geförmte Zellschicht um das Explantat ausbildete. Es hatte sich ein Zellrasen gebildet, der den Kontakt zum Ursprungsslice beibehielt, und dessen eigentliche Proliferationszone nicht im Bereich der Wachstumsfront, sondern in slice nah ausgerichteten Zellschichten angeordnet war. Durch Zellteilung neu entstandene Zellen hatten bereits ausgebildete Zellschichten in der vorderen Linie angelagert.

Wie viele Untersuchungen noch notwendig sind, werden durch diese vielen Ansätze unterschiedlichen Wachstumsverhaltens verschiedener Individuen unter verschiedenen Bedingungen deutlich. Die zeitliche Darstellung des Wachstums von Rattenkornea aus zentralen und peripheren Bereichen in der fotografischen als auch rein statistischen Darstellungen zeigt auch ein lineares Verhältnis zwischen Zeitdauer und Wachstum, welches einen deutlichen Zusammenhang zu gleichmäßig ausgeprägtem Wachstum beider Areale zulässt. Die Abbildungen mittels immunfluoreszierender Darstellung der wichtigsten Antikörper im kornealen Epithelgewebe deuten ebenfalls auf die ausgeglichene Ausprägung von neu entstandenen Epithelzellen in beiden Gewebereichen. Die Schwierigkeiten in der Qualität der Darstellung werden durch die Verfahren der immunfluoreszierenden Anfärbung robust fixierter Gewebe erzeugt, die teilweise nur durch den Gebrauch beträchtlicher Mengen an Antikörpern möglich

wurde. Aufgrund der großen Schichtdicken der Slices war eine Vielzahl von Färbungen nötig, um überhaupt einzelne Zellen der jeweiligen Gewebe sichtbar zu machen. Wahrscheinlich ist, dass trotz größter Sorgfalt und Rücksichtnahme auf das empfindliche neu entstandene Korneaepithel ein Abscheren von Gewebe von dem Ursprungsslice nicht zu verhindern ist und dadurch das immunfluoreszierende Gewebe in seinem Durchmesser lange nicht mehr die Größe darstellt, wie bei den Aufnahmen der mikroskopischen Fotodokumentation.

Die Hornhautperipherie als auch das Hornhautzentrum von Ratten in diesem Hornhaut-Slice in- vitro Modell stellen regenerative Bereiche für das Epithel dar. Dieses Modell ist ausgesprochen geeignet um Untersuchungen der Pathophysiologie von Hornhauterkrankungen und auch von regenerativen Prozessen nach traumatischen Verletzungen darzustellen. Der Gebrauch dieses Modells ist bei nahezu allen Spezies möglich, was neben den durchgeführten Versuchen auch bereits bei anderen Untersuchungen festgestellt wurde [40].

Zukünftige Arbeiten sollten weiter das Ziel haben, mittels dieses Modells Grundlagen zu schaffen, um Epithelwachstumsbedingungen zu optimieren und so Hornhautepithel dauerhaft in- vitro züchten zu können. Dadurch könnte ein neues selektives Verfahren zur Behandlung therapierefraktärer Hornhauterkrankungen –wie schweren Verletzungen, Erosionen, Verätzungen etc.- in Form von Epitheltransplantationen etabliert werden. Die Reepithelialisierung der Hornhaut in geschädigten Arealen, als auch die Züchtung von Korneagewebe (so genanntes „tissue- engineering“), wie es bereits heutzutage in vielen Bereichen der Medizin durchgeführt wird, stellen hier unter Anderem die gesetzten Ziele dar.

Allerdings ist bei dieser Vision aktuell zu berücksichtigen, dass der Zell-turn-over der Epithelzellen so hoch ist, dass ein Patient ständigen Re-Operationen ausgesetzt wäre.

Insgesamt ist das Verständnis der Zellbiologie, Morphologie und Physiologie der Kornea allgemein der Schlüssel mit dem Zukunftsperspektiven des selektiven Gewebeersatzes im Auge erreicht werden können, damit die auch in der heutigen Zeit mit vielen Problemen behaftete Hornhauttransplantation mittelfristig vielleicht nicht vollständig ersetzt, aber eine gleichberechtigte Therapiealternative bekommen kann. Um dies zu erreichen sind noch viele Untersuchungen notwendig.

E. Abkürzungen:

AK	Antikörper
FKS	Fetales Kälber Serum
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
min.	Minutes (Minuten)
PBS	Phosphate- Buffered Salt Solution
PFA	Paraformaldehyd
SD Stabwn	Standardabweichung

F. Literaturverzeichnis:

1. Baum JL, Niedra R, et al. (1979) Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 97(6):1136-1140.
2. Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, et al. (1998) Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34(2):149-153.
3. Bourne WM, Kaufman HE (1976) Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am J Ophthalmol* 81(3):319-323.
4. Bredehorn T, Schilling-Schon A, et al. (2002) Replacement of eye tissue: possibilities, limits, and prospects of structure and function. *Transplant Proc* 34(6):2341-2342.
5. Chang CY, Green CR, et al. (2008) Acute wound healing in the human central corneal epithelium appears to be independent of limbal stem cell influence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(12):5279-5286.
6. Daniels JT, Dart JK, et al. (2001) Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen* 9(6):483-494.
7. Dohlman CH (1971) The function of the corneal epithelium in health and disease. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Invest Ophthalmol* 10(6):383-407.
8. Engelmann K, Bednarz J, et al. (1999) [Endothelial cell transplantation and growth behavior of the human corneal endothelium]. *Ophthalmologe* 96(9):555-562.
9. Fabricant RN, Alpar AJ, et al. (1981) Epidermal growth factor receptors on corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 99(2):305-308.
10. Friend J (1883) *Physiology of the cornea*. GSmolin and RA Thoft: The Cornea, Scientific Foundations and Clinical Practice Boston/Toronto Little Brown & Company:17- 30.
11. Grayson M (1983) *Diseases of the cornea*. The CV Mosby Company St Louis:1-13.
12. Grehn (2003) *Augenheilkunde*. In: (Hrsg) Springer, 28. Edition
13. Hainsworth S (1991) Modified culture method for human corneal epithelial cells. *J Tissue Culture Methods* 13:45- 48.

14. Hanna C, Bicknell DS, et al. (1961) Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* 65:695-698.
15. Hanna C, O'Brien JE (1960) Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch Ophthalmol* 64:536-539.
16. Hyldahl L (1985) Factor VIII expression in the human embryonic eye. Differences between endothelial cells of different origin. *Ophthalmologica* 191(3):184-187.
17. Hyldahl L (1986) Control of cell proliferation in the human embryonic cornea: an autoradiographic analysis of the effect of growth factors on DNA synthesis in endothelial and stromal cells in organ culture and after explantation in vitro. *J Cell Sci* 83:1-21.
18. Insler MS, Lopez JG (1991) Extended incubation times improve corneal endothelial cell transplantation success. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(6):1828-1836.
19. Jakus MA (1954) Studies on the cornea. I. The fine structure of the rat cornea. *Am J Ophthalmol* 38(1:2):40-53.
20. Jumblatt MM, Maurice DM, et al. (1978) Transplantation of tissue-cultured corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17(12):1135-1141.
21. Kahn CR, Young E, et al. (1993) Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(12):3429-3441.
22. Kanski (2007) *Klinische Ophthalmologie*. In: (Hrsg) Urban & Fischer, 6th.
23. Kruse FE, Völcker, H.E. (1996) Die Stammzellen des Hornhautepithels am Limbus: Physiologie und Bedeutung für Hornhauterkrankungen. In: (Hrsg) *Das äußere Auge*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
24. Kuwabara T, Perkins DG, et al. (1976) Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Invest Ophthalmol* 15(1):4-14.
25. Lavker RM, Dong G, et al. (1991) Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(6):1864-1875.
26. Lindstrom RL (1990) Advances in corneal preservation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 88:555-648.
27. Maurice DM (1984) *The cornea and sclera*. H Davson, *The eye Academic Press*:1-158.

28. McCulley JP, Maurice DM, et al. (1980) Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology* 87(3):194-201.
29. Naumann GOH (1980) Pathologie des Auges. In: (Hrsg) Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. 16- 18 p
30. Nayak SK, Binder PS (1984) The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(10):1213-1216.
31. Newsome DA, Foidart JM, et al. (1981) Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20(6):738-750.
32. Samples JR, Binder PS, et al. (1991) Propagation of human corneal endothelium in vitro effect of growth factors. *Exp Eye Res* 52(2):121-128.
33. Sauerborn M (2000) Der Hornhautsliche in -vitro: Wachstumsdynamik des Epithels und Interaktionen mit humanen Gefäßendothelzellen.
34. Schermer A, Galvin S, et al. (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103(1):49-62.
35. Schwarz W, Keyserlingk, D.G. (1966) Über die Feinstruktur der menschlichen Kornea, mit besonderer Berücksichtigung des Problems der Transparenz. *Zellforsch* 73:540- 548.
36. Sharma A, Coles WH (1989) Kinetics of corneal epithelial maintenance and graft loss. A population balance model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(9):1962-1971.
37. Straub W, Köhler, U. (1992) Krankheiten der Hornhaut in: Axfeld, T. und Pau, H.: Lehrbuch der Augenheilkunde. In: (Hrsg) Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York. 229-231 p
38. Svedberg B, Bill, A. (1972) Scanning electron microscope studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 50:321-336.
39. Teng CC (1961) The fine structure of the corneal epithelium and basement membrane of the rabbit. *Am J Ophthalmol* 51:278-297.
40. Thanos S, Steuhl KP, et al. (1996) Development of a new slice-culture method to study epithelial corneal pathophysiology in the paradigm of corneovascular interactions. *Ger J Ophthalmol* 5(6):466-478.

G. Lebenslauf:

H. Danksagung:

Mein allergrößter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos für die Bereitstellung dieser begeisternden Thematik und für die intensive Betreuung dieser Dissertation.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeiter der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie des Universitätsklinikums Münster, besonders den netten, kompetenten MTA's Mechthild Langkamp-Flock und Mechthild Wissing für die engagierte Unterstützung bei meinen Experimenten und Untersuchungen.

I. Anhang:

I.

	Periphere Corneaslices Ratte nach 3 Tagen (in μm^2)			Zentrale Corneaslices nach 3 Tagen (in μm^2)		
Slice				Slice		
1	247158,79		352596,54	1		159154,11
2	281363,91		281363,91	2		313932,03
3	151188,79		151188,79	3		473743,39
4	93969,18		93969,18	4		402237,59
5	340696,78		340696,78	5		343394,27
6	434149,37		434149,37	6		424386,33
7	128562,22		128562,22	7		358739,8
8	228035,46		228035,46	8		0
9	190507,83		190507,83	9		0
10	397361,93		397361,93	10		225304,08
11	88279,41		88279,41			
12	406066,53		406066,53			
13	241759,08		241759,08			
14	197884,43		197884,43			
15	194672,16		194672,16			
16	332884,73		332884,73			
Mittelwert	247158,79		253748,65			275065,28
Stabwn.:	106306,90		109327,7219			168615,5
Mittelwert:		250453,72				

II.

Bilder periphere Corneaslices Tag 6 (in μm^2)		Bilder zentrale Corneaslices Tag 6 (in μm^2)	
Slice		Slice	
1	135062,50	1	0,00
2	84651,51	2	0,00
3	592294,64	3	390097,12
4	156052,73	4	245073,23
5	635055,85	5	0,00
6	1013589,50	6	419517,88
7	823575,73	7	329808,59
8	557150,74	8	212727,79
9	80767,57	9	267910,76
10	0,00	10	814462,71
11	909795,96	11	346648,91
12	536269,60	12	472841,82
13	561700,04	13	267597,92
14	564567,01	14	600642,22
15	222135,62	15	145079,79
16	574523,89	16	302266,69
17	672587,99	17	252832,09
18	342149,20	18	692575,67
19	0,00	19	348086,91
20	0,00		
21	0,00		
22	0,00		
23	0,00		
24	0,00		
25	397834,35		
26	791800,08		
27	206977,61		
28	592376,68		
29	0,00		
30	661520,38		
Mittelwert	370414,64		321482,64
Stabwn.:	317555,13		213615,65

III.

Periphere Corneaslices Ratte nach 9 Tagen (in μm^2)			Zentrale Corneaslices Ratte nach 9 Tagen (in μm^2)		
Slice			Slice		
1	488315,38				
2	645852,99		1	942682,34	
3	225648,12		2	517473,78	
4	1009433,28		3	366428,34	
5	1588273,87		4	100402,75	
6	1787315,91		5	484416,11	
7	344537,45		6	620913,00	
8	0,00		7	369327,77	
9	366337,28		8	349287,79	
10	1462757,13		9	762069,18	
11	825212,97		10	801016,78	
12	464417,60		11	418220,53	
13	378959,19		12	296094,58	
14	411584,11		13	294748,54	
15	232356,66		14	744466,13	
16	286122,37		15	1858892,93	
17	386944,35		16	757802,08	
18	270042,06		17	1489904,15	
19	351134,20		18	660997,47	
20	398334,72		19	394870,00	
21	0,00		20	132021,53	
22	654362,86		21	0,00	
23	259318,85		22	0,00	
24	439159,37		23	0,00	
25	1579602,62				
Mittelwert:	594240,93			537479,82	
Stabwn:	491554,97			443353,18	

IV.

Periphere Corneaslices Ratte nach Sa- Di 12 Tagen (in μm^2)			Zentrale Corneaslices Ratte nach Sa- Di 12 Tagen (in μm^2)		
Slice			Slice		
1	454176,73		1		0,00
2	1611089,77		2		0,00
3	426805,23		3		392452,01
4	388445,45		4		323110,86
5	362205,41		5		425183,31
6	478564,96		6		2274571,95
7	460678,81		7		1505669,81
8	299534,05		8		2249677,95
9	191317,43		9		0,00
10	371078,61		10		912889,23
11	615894,89		11		0,00
12	2802943,85		12		2315242,43
13	1914194,01		13		494371,19
14	1550033,10		14		127245,04
15	2542264,53		15		2142359,29
16	1458345,78		16		1491632,45
17	738658,25		17		583387,18
18	1364036,70		18		533765,06
19	1881354,52		19		2732742,61
20	1025067,32		20		920640,88
21	0,00		21		0,00
22	0,00				
Mittelwert:	951667,70				924997,20
Stabwn:	795885,62				904555,68

V.

Periphere Corneaslices Ratte nach Di- Fr. 15 Tagen		Zentrale Corneaslices Ratte nach Di- Fr. 15 Tagen (in μm^2)		
Slice		Slice		
	292914,76			175406,62
1	616978,57	1		201444,71
2	480037,21	2		343598,92
3	37193,15	3		0,00
4	582143,92	4		254286,32
5	515658,03	5		94268,50
6	2745734,16	6		131265,11
7	430452,96	7		0,00
8	3946041,31	8		182862,56
9	259369,34	9		232207,90
10	317199,30	10		0,00
11	354017,40	11		475478,90
12	283085,90	12		534864,97
13	511914,73	13		1005476,32
14	251151,58	14		273106,48
15	387041,72	15		222642,30
16	607201,11	16		652859,05
17	2293817,65	17		0,00
18	534994,79			
19	0,00			
20	0,00			
21	304792,87			
Mittelwert:	715988,20		265542,70	
Stabwn:	957703,28		255151,14	