Aus dem Institut für Klinische Chemie
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck
Leiter: Prof. Dr. med. M. Seyfarth
und der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Lübeck
Dekan: Prof. Dr. med. W. Solbach

Vergleich der epitheliotrophen Kapazität von Serum und Plasma am Modell einer immortalisierten humanen Hornhautepithelzelllinie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -
vorgelegt von
Philipp Herminghaus
aus Hagen

Lübeck, 2008

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Hartwig
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Salvatore Grisanti
Tag der mündlichen Prüfung:	15.06.2009
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	15.06.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 6

1.1 Anatomie der Horn- und Bindehaut 6

1.2 Der Tränenfilm und die Ernährung der Augenoberfläche 7

1.3 Korneale Wundheilungsreaktion und -störungen 9

1.4 Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche 10

1.5 Fragestellung 12

2 Material und Methoden 14

2.1 Probanden, Gewinnung und Lagerung der Blutpräparate 14

2.2 Zelllinie 15

2.3 Kulturmedien und -zusätze 15

2.4 Geräte und Chemikalien 16

2.5 Zellkultur, -passage und -zählung 16

2.6 Blutbild und Thrombozytenzählung in Blutpräparaten 17

2.7 Biochemische Charakterisierung der Blutpräparate 18

2.7.1 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford 18

2.7.2 Quantifizierung von Wachstumsfaktoren und Fibronektin mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 18

2.7.3 Bestimmung von Retinol und Tokopherol mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) 19

2.8 Evaluation von Proliferation, Migration und Differenzierung im Zellkulturmodell 20

2.8.1 Einfluss von Zitrat auf den relativen ATP-Gehalt der Zellen 21

2.8.2 Messung der Zellproliferation in Dosis- und Zeit-Wirkungsexperimenten mittels ATP-Assay....22

2.8.3 Messung der Zellmigration im Kolonie-Dispersions-Versuch....23

2.8.4 Bestimmung der Zelldifferenzierung mittels Rasterelektronenmikroskopie und Immunhistochemie....24

2.9 Statistik....26

3 Ergebnisse....27

3.1 Blutbild und Thrombozytenzählung in Blutpräparaten....27

3.2 Biochemischer Charakter der Blutpräparate....28

3.2.1 Gesamtprotein....28

3.2.2 EGF....29

3.2.3 PDGF-AB....29

3.2.4 TGF-β_2....30

3.2.5 Fibronektin....30

3.2.6 Retinol und Tokopherol....30

3.2.7 Einfluss des Geschlechtes auf den biochemischen Charakter der Blutpräparate....31

3.3 Evaluation von Proliferation, Migration und Differenzierung am Zellkulturmodell....33

3.3.1 Einfluss von Zitrat auf die Proliferation der Zellen....33

3.3.2 Proliferation....34

3.3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung....34

3.3.2.2 Zeit- Wirkungsbeziehung 40

3.3.2.3 Korrelation der Proteinkonzentration mit dem ATP-Gehalt der Zellen 43

3.3.3 Migration 43

3.3.4 Differenzierung 44

3.3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie 44

3.3.4.2 Immunhistochemie 46

4 Diskussion 49

4.1 Empfehlungen für ein standardisiertes Produktionsverfahren zur Herstellung von Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche 55

5 Zusammenfassung 56

6 Literaturverzeichnis 57

7 Anhang 65

8 Danksagung 69

9 Lebenslauf 71

10 Publikationen 73

11 Abkürzungsverzeichnis 74

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Horn- und Bindehaut

Die Hornhaut (Cornea) des Auges hat eine entscheidende Funktion für den Sehapparat. Sie ist das optische Fenster des Auges, das dem Menschen das Sehen erst ermöglicht. Mit 43 dpt hat sie den stärksten Anteil an der Gesamtbrechkraft des Auges. Sie ist wie ein Uhrglas mit seichter Randfurche (Limbus corneae) in die schwächer gekrümmte Lederhaut (Sklera) eingefügt.

Das Gewebe der Cornea besteht aus fünf Schichten. Die Oberfläche wird von einem mehrschichtigen, nicht verhornenden Plattenepithel gebildet, das sich im Verletzungsfall sehr rasch regeneriert. Die Basalzellen des Plattenepithels sind durch eine dünne Basalmembran fest in der Bowman-Lamelle verankert. Diese ist höchst widerstandsfähig, jedoch nicht regenerationsfähig. An die Bowman-Lamelle schließen sich die Kollagenlamellen an, die in ihrer Gesamtheit das Hornhautstroma bilden. Das Stroma ist ein bradytrophes Gewebe, das sich aufgrund seiner Gefäßfreiheit nur langsam regeneriert. Das Hornhautstroma schließt zur Vorderkammer hin mit der Descemet-Membran und dem Hornhautendothel ab (Abb. 1).

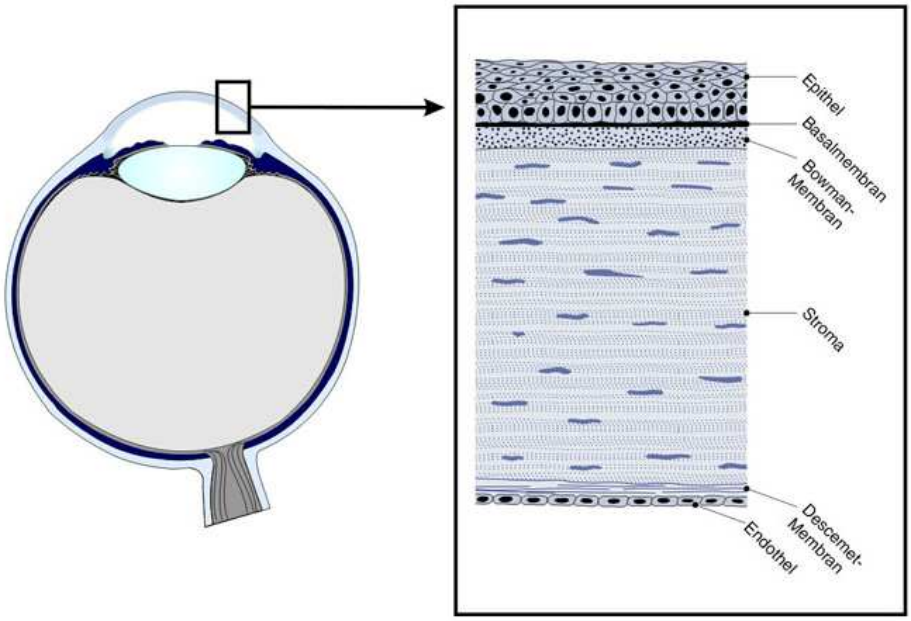


Abb. 1 Cornea als Teil der Augenhülle, nebenstehend vergrößerte Darstellung der einzelnen Schichten.

Ein wichtiges Merkmal der Cornea ist ihre Transparenz, die sowohl auf der regelmäßigen Anordnung der Kollagenlamellen im Hornhautstroma und der faltenfreien, glatten Endothel- und Epitheloberfläche, als auch auf dem konstanten Wassergehalt des Hornhautstromas von 70 % beruht.

Die Cornea ist hochempfindlich und hat eine ausgeprägte sensible Innervation aus dem ersten Trigeminusast. Schon bei der leichtesten Berührung wird der schützende reflektorische Lidschluss ausgelöst. Jede Verletzung der Hornhautoberfläche führt zur Freilegung sensibler Nervenendigungen und damit zu Schmerzen. Die Folgen sind Tränenfluss und krampfhafter Lidschluss.

Die Bindehaut (Conjunctiva) ist eine dünne, transparente, gefäßführende und normalerweise glänzende Schleimhautschicht. Sie bildet zusammen mit der Cornea die Augenoberfläche. Die Conjunctiva bulbi ist auf der Sklera leicht verschieblich und haftet am Limbus corneae (Hornhautrand) fest an. Das Bindehautepithel geht hier in das Hornhautepithel über. Die Conjunctiva tarsi kleidet die Innenseite der Lider aus und ist dort fest mit dem Tarsus verbunden. Im Fornix conjunctivae bildet die lockere Conjunctiva fornicis eine Umschlagfalte und geht in die Conjunctiva bulbi über. Nasal befindet sich im Lidspaltenbereich eine halbmondförmige Schleimhautfalte (Plica semilunaris) sowie die daran anschließende Karunkel, die Haare und Talgdrüsen enthält. Der Bindehautsack erfüllt drei Hauptaufgaben. Er dient der Beweglichkeit des Bulbus, stellt eine Gleitschicht für das Aufeinandergleiten der Schleimhautschichten dar und hat durch follikelähnliche Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen unter der Conjunctiva tarsi und in den Umschlagsfalten auch eine immunologische Schutzfunktion [36, 52].

1.2 Der Tränenfilm und die Ernährung der Augenoberfläche

Der Tränenfilm benetzt Binde- und Hornhaut und besteht aus drei Schichten. Er sichert die glatte Oberfläche der Cornea und trägt zu Ihrer Ernährung bei. Die äußere Lipidschicht mit einer Stärke von zirka 0,1 µm wird von Meibom-, Talg- und Schweißdrüsen des Lidrandes gebildet. Die Funktion besteht in der Stabilisierung des Tränenfilms. Durch ihr hydrophobes Verhalten wird ein schnelles Verdunsten der Tränenflüssigkeit verhindert. Mit 8 µm Schichtdicke wird die mittlere, wässrige Schicht von der Haupttränendrüse sowie akzessorischen Tränendrüsen gebildet. Die Aufgabe dieser Schicht besteht in Reinigung, Schutz und guter Gleitfähigkeit der Conjunctiva tarsi gegenüber der Cornea.

Durch Bildung einer glatten Hornhautoberfläche sorgt sie für die gute Qualität der optischen Abbildung.

Von Becherzellen der Bindehaut und der Haupttränendrüse wird die innere Muzinschicht, zirka 0,8 µm dick, gebildet. Ihre Aufgabe besteht ebenfalls in der Tränenfilmstabilisierung. Sie verhindert, dass die wässrige Schicht von der hydrophoben Hornhautoberfläche abperlt. Ohne den Tränenfilm ist die Epitheloberfläche rau und nur unscharfes Sehen möglich.

Das Hornhautgewebe hat keine Gefäße, ist zellarm, strukturlos und hat einen trägen Stoffwechsel, was eine langsame Heilung bedingt. Der Nährstoffbedarf der Hornhaut wird zu 90 % durch das Kammerwasser gedeckt. Die Ernährung erfolgt durch Aminosäuren, Elektrolyte und Glukose, die aus drei Quellen stammen: Diffusion aus dem Randschlingennetz sowie Stoff- und Ionenaustausch aus Kammerwasser und Tränenfilm [19, 36]. Für den Metabolismus werden vor allem Glukose und Sauerstoff benötigt, die von außen zugeführt werden. Die benötigten Substanzen aus dem Tränenfilm und dem Kammerwasser müssen durch Diffusion in die gefäßlose Cornea eindringen. Ebenso werden die Stoffwechselendprodukte durch Diffusion aus der Hornhaut herausgeleitet. Nur das Randschlingennetz als peripheres Gefäßsystem im Limbusbereich ist in der Lage, die Peripherie der Cornea mit Glukose und Sauerstoff direkt zu versorgen.

Die Tränenflüssigkeit liefert den größten Anteil an der Sauerstoffzufuhr, wobei Sauerstoff bei geöffneten Lidern aus der Atmosphäre in den Tränenfilm gelangt und bei geschlossenen Lidern aus den Gefäßen des Randschlingennetzes und der Bindehaut in den Tränenfilm diffundiert. Während im Tränenfilm nur sehr wenig Glukose vorhanden ist (etwa 0,2 µmol/g Wasser), existiert im Kammerwasser wenig gelöster Sauerstoff. Dieser reicht gerade aus, um das Hornhautendothel zu versorgen. Im Gegenzug befindet sich im Kammerwasser der größte Anteil an Glukose (etwa 6,5 µmol/g Wasser). Beim Abbau der Glukose entstehen dabei durch den Zucker Ribose unter anderem die erforderlichen Nukleinsäuren über den Hexosemonophosphat-Weg für den Aufbau von neuem Gewebe und Zellen, wie z. B. der Basal- und Epithelzellen. Bei diesen Prozessen wird unterschiedlich viel Energie geliefert, die in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert wird.

Neben den oben genannten Substanzen sind auch zahlreiche Proteine, z. B. Wachstumsfaktoren, für die physiologischen Erhaltungsvorgänge und Wundheilung der

Oberflächenepithelien verantwortlich. Auf diese wird im Folgenden noch näher eingegangen.

1.3 Korneale Wundheilungsreaktion und -störungen

Das korneale Epithel ist nicht nur in der Lage epitheliale Defekte (Erosio) in wenigen Stunden bis Tagen wieder komplett zu decken, sondern unterliegt auch einer physiologischen, ständigen Erneuerung aus den auch für die reguläre epitheliale Wundheilung der Hornhaut unerlässlichen Limbusstammzellen. Die an der Oberfläche gelegenen Flügelzellen werden abgeschilfert und der Zellverlust wird durch die konstante Neubildung im Bereich der limbalen Stammzellen ausgeglichen, welche ausschließlich in der basalen Schicht des limbalen Epithels lokalisiert sind. Aus den Stammzellen gehen sogenannte Teilungszellen mit hohen Mitoseraten hervor, die nach einer begrenzten Zahl von Zellteilungen eine Ausdifferenzierung vollziehen und dabei zur Oberfläche wandern, wo sie zu Flügelzellen werden.

Bei einer Verletzung des kornealen Epithels werden die Proliferation und die Bildung der Teilungszellen aufgrund von Signalen des geschädigten Epithels erhöht. Wachstumsfaktoren, z. B. TGF (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) oder Fibronektin übernehmen dabei wichtige Aufgaben in der Induktion und Steuerung der Wundheilung sowie der Integrität der kornealen Augenoberfläche [15, 23, 26, 27, 32, 45, 66].

Fibronektin, EGF und FGF wurden bereits klinisch zur Therapie von Epitheldefekten getestet. Da die Effektivität der einzelnen Wirkstoffe und ihre Stabilität jedoch zu gering ist, haben sie sich bis heute nicht in den therapeutischen Standardkonzepten etablieren können [16, 31, 37, 39, 40, 55, 63].

EGF, welches direkt von der Tränendrüse sezerniert wird, unterstützt beispielsweise den Wundheilungsprozess durch Beschleunigung der Reepithelisierung und Stimulierung der Proliferation kornealer Zellen und wirkt zudem antiapoptotisch [2, 4, 7, 15, 23, 29, 31, 32, 38, 42, 48, 50, 51, 55, 56, 59].

PDGF spielt ebenfalls eine Schlüsselrolle in der kornealen Wundheilung. Es wird sowohl in kornealen Epithelzellen, als auch in Keratozyten und Endothelzellen exprimiert, unterstützt die Wundheilung durch temporäre Stimulierung der Proliferation von Fibroblasten und induziert die Migration dieser Zellen [8, 26, 30, 62].

TGF-β hat konzentrationsabhängig eine proliferative oder eine antiproliferative Wirkung auf korneale Epithelzellen. Hohe Konzentrationen dieses Proteins unterdrücken die Wundheilung der Augenoberfläche, niedrigere Konzentrationen fördern sie [3, 26, 35, 58]. Es gibt 5 Isoformen (TGF-β_1, -β_2, -β_3, -β_4, -β_5) von denen nur die ersten drei in Säugetierzellen exprimiert werden [52]. TGF-β_2 hat vermutlich einen stärkeren inhibitorischen Effekt als TGF-β_1.

Fibronektin ist ein disulfidhaltiges Glykoprotein und transitorischer Bestandteil der Basalmembran. Es stimuliert die Zelladhäsion bzw. die Migration von Keratozyten und gelangt bei erhöhter Permeabilität der Bindehautgefäße aus dem Plasma in den Tränenfilm [14, 16, 21, 50]. Nishida berichtete, dass die topische Gabe von Fibronektin die Heilung persistierender Epitheldefekte fördere [43]. Bei trockenem Auge fand sich jedoch in einer klinischen Studie von Nelson kein Vorteil bei der Anwendung von Fibronektin im Vergleich mit kommerziell erhältlichen nicht-fibronektinhaltigen Benetzungsmitteln (1,4 % Polyvinylalkohol) [40].

Die Förderung der Zelldifferenzierung der Augenoberflächenepithelien durch Retinol (Vitamin A) ist bekannt und wird teilweise durch Reduktion der EGF-Rezeptoren in Bindehautepithelzellen vermittelt [33]. Tokopherol (Vitamin E) wird die Steigerung der Fibronektinsynthese zugesprochen, hat aber keine Wirkung auf die Zellproliferation [53]. Die Synthesesteigerung durch Tokopherol, einem starken Antioxidans, beruht vermutlich auf einem antiapoptotischen Effekt durch Abfangen freier Radikale [41].

Bei einem schweren Tränenmangel ist die Konzentration dieser Proteine, die wichtige Beiträge zu den epithelialen Regenerations- und Heilungsprozessen leisten, an der Augenoberfläche stark vermindert. Pharmazeutische Tränensubstitute ersetzen lediglich die physikalischen Funktionen des natürlichen Tränenfilms und nicht die oben erwähnten nutritiven und wundheilungsfördernden Proteine.

1.4 Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche

Blutserum ist der flüssige, nach erfolgter Gerinnung verbleibende Teil des Blutes. In der Therapie der Augenoberfläche stellen Augentropfen (AT) aus Eigenserum einen neuen Ansatz dar. Serum-AT sind in ihren biomechanischen und biochemischen Eigenschaften der natürlichen Träne sehr ähnlich und können als unkonserviertes, autologes Blutprodukt hergestellt werden [19, 25]. Serum-AT enthalten eine Vielzahl an epitheliotrophen Stoffen,

die auch im natürlichen Tränenfilm vorzufinden sind (Tab.1). Ein Teil dieser Faktoren ist in Thrombozyten gespeichert und wird bei der Koagulation des Vollblutes von Thrombozyten freigesetzt. Dazu gehören unter anderem EGF, TGF-β und PDGF, welche positive Auswirkungen auf Wachstum und Differenzierung der Augenoberflächenzellen besitzen.

	Tränenflüssigkeit	Serum
pH	7,4	7,4
Osmolalität	298 +/- 10	296
EGF (ng/ml)	0,2 - 3,0	0,5
TGF-β (ng/ml)	2 -10	6 - 33
PDGF (ng/ml)	0 - 1,33	15,5
Vitamin A (mg/ml)	0,02	46
Albumin (mg/ml)	0,023 +/- 0,016	35-53
Fibronektin (µg/ml)	21	205

Tab. 1 Eigenschaften und Zusammensetzung von unverdünntem Serum und natürlicher, nicht stimulierter humaner Tränenflüssigkeit (EGF, epidermal growth factor; TGF transforming growth factor; PDGF, platelet derived growth factor) [17, 21, 27, 58, 60, 61, 67, 68].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Serum-AT Vitamin A enthalten, und dass Bindehautepithelzellen nach Inkubation mit Serum als Zeichen einer verstärkten Differenzierung vermehrt Muzin exprimieren [58, 59]. Einzelne Serumbestandteile werden seit längerem therapeutisch im klinischen Alltag und fetales Kälberserum in vitro zur Förderung von Zellkulturwachstum eingesetzt. Die Verwendung von Augentropfen aus Eigenserum wurde erstmalig 1984 von Fox zur Behandlung des trockenen Auges beschrieben [14]. Serum-AT wurden jedoch erst 15 Jahre später von Tsubota erneut klinisch aufgegriffen, der erkannte, dass sie nicht nur weniger toxisch sind, sondern potentiell direkte epitheliotrophe Wirkungen entfalten können [22, 57]. Die deutlich geringere Toxizität von Serum im Vergleich zu pharmazeutischen Tränenersatzmitteln wurde jedoch in Dosis- und Zeit-Wirkungsexperimenten erst im Jahr 2001 belegt [18]. In Zellkulturexperimenten unterstützte Serum dabei die Proliferation, Morphologie und den intrazellulären Stoffwechsel humaner Hornhautepithelzellen besser als konservierte oder

unkonservierte pharmazeutische Produkte. Mittlerweile konnte auch gezeigt werden, dass Primärkulturen humaner Keratozyten nach Inkubation mit Serum vermehrt Wachstumsfaktorrezeptoren transkribieren, sodass zusätzlich auch von einem indirekt trophischen Effekt auszugehen ist [10].

Die häufigsten Indikationen für die Therapie von Augenoberflächenerkrankungen mit autologen Serum-AT sind schwerer Tränenmangel, persistierende Epitheldefekte und die adjuvante Therapie bei chirurgischen Rekonstruktionsversuchen der Augenoberfläche [10, 14]. Letztere sind ohne die Anwendung von Eigenserumtropfen bei absolutem Tränenmangel regelmäßig zum Scheitern verurteilt.

1.5 Fragestellung

Erste klinische Studien berichten über den erfolgreichen Einsatz von Eigenserum in der Therapie schwer trockener Augen und persistierender Epitheldefekte. In den bislang publizierten Studien sind die Protokolle zur Herstellung von Serum-AT jedoch oft nur unvollständig angegeben oder weichen in wesentlichen Präparationsschritten voneinander ab [19, 57]. So wurden Serum-AT mit verschiedenen Zentrifugationsbedingungen in Konzentrationen von 20 bis 100 % hergestellt. Zur Verdünnung von Serum-AT wurden sowohl Balanced Salt Solution (BSS, eine okuläre Spüllösung), NaCl (0,9%ige physiologische Kochsalzlösung) als auch chloramphenicol-haltige Lösungen verwendet [14, 19, 22]. NaCl wird in der klinischen Routine als Verdünnung von Augentropfen verwendet. BSS besitzt im Gegensatz zu NaCl eine Pufferwirkung und ist daher die theoretisch bessere Variante.

Ebenfalls könnten das Geschlecht oder die Thrombozytenzahl (Speicher von epitheliotrophen Faktoren) einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Serum-AT haben. Die genannten Parameter könnten den biochemischen Charakter und damit die epitheliotrophe Wirkung von Serum-AT beeinflussen. Eine Vergleichbarkeit der kurativen Wirkung dieser verschiedenen Präparate wird somit unmöglich. Um den letztendlichen Stellenwert von Serum-AT bei Erkrankungen der Augenoberfläche in prospektiven randomisierten Studien klären zu können, muss ihre Herstellung also zuvor optimiert und standardisiert werden. Die individuelle Herstellung von autologen Serum-AT ist zeit- und arbeitsaufwendig. Gefrorenes Frischplasma (GFP) ist - anders als Serum - als qualitätskontrolliertes heterologes Blutprodukt von Blutbanken erhältlich und könnte alternativ zur Behandlung

von Augenoberflächenerkrankungen verwendet werden. Daher stellt sich die Frage, ob Plasmapräparate eine ähnliche epitheliotrophe Kapazität besitzen wie Serumpräparate oder ob z. B. die bei ihrer Herstellung erforderlichen Antikoagulantien eventuell nachteilig wirken.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit sollten daher die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben Geschlecht, Thrombozytenzahl und Gerinnungsparameter des Spenders auf den biochemischen Charakter und die epitheliotrophe Potenz von Serum-AT?

2. Beeinflusst die Verwendung eines Antikoagulans bei der Herstellung von Plasma den biochemischen Charakter und die epitheliotrophe Potenz von GFP im Verlgleich zu Serum?

3. Wie beeinflussen die Zentrifugationsbedingungen den biochemischen Charakter und die epitheliotrophe Potenz von Blutpräparaten?

4. Welche Auswirkungen hat die Verwendung unterschiedlicher Diluentien auf die epitheliotrophe Potenz von Plasma und Serum?

Aus den Antworten auf diese Fragen sollten Empfehlungen für ein standardisiertes Produktionsverfahren zur Herstellung von Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche abgeleitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden, Gewinnung und Lagerung der Blutpräparate

Bei 10 Probanden (mittleres Alter 59,2 ± 4,5 (53 – 67) Jahre, Geschlechtsverhältnis männlich: weiblich = 5:5) wurden unter sterilen Bedingungen je 200 ml Vollblut in Einmalcontainern zur Gewinnung von Plasma und 200 ml zur Gewinnung von Serum entnommen. Für die Plasmaherstellung erfolgte die Entnahme in Einmalcontainern mit Zitratpuffer, wie er üblicherweise in Blutspendeeinrichtungen zur GFP-Herstellung eingesetzt wird und der auf 1000 ml physiologischer Kochsalzlösung 2,99 g Zitronensäure, 26,3 g Trinatriumzitrat, 2,22 g monobasisches Natriumphosphat, 31,9 g Dextrose und 0,275 g Adenin enthielt. Für Serum wurden handelsübliche 20 ml Einmalspritzen verwendet. Zur Präparation von Serum wurde das entnommene Vollblut auf 4 sterile 50 ml Einmalcontainer verteilt und die spontane Gerinnung der nicht antikoagulierten Vollblutproben über 2 Std. bei 21° C abgewartet. Nach Zentrifugation der Präparate bei 500 und 3000 G (Abb. 2) wurde der Überstand unter sterilen Bedingungen abgehoben und in 2,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) aliquotiert. Antikoaguliertes Vollblut für die Plasmaherstellung wurde sofort nach Entnahme auf 4 sterile 50 ml Einmalcontainer verteilt und zentrifugiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70° C aufbewahrt und nur einmal zu ihrer Verwendung aufgetaut.

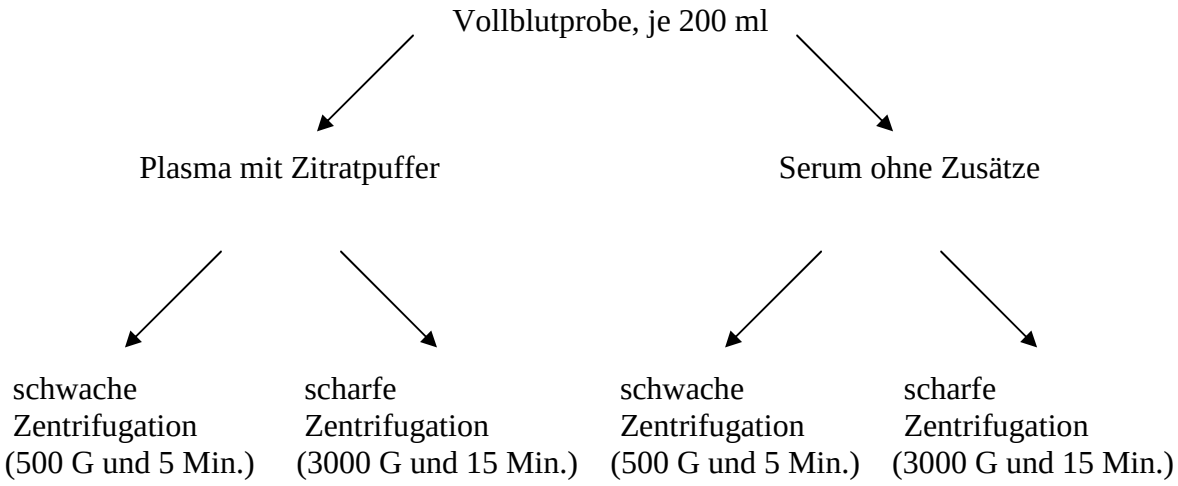


Abb. 2 Herstellung der Präparate aus Vollblutproben.

Im Folgenden werden entsprechend die Bezeichnungen Plasma- bzw. Serum- (500 G) oder (3000 G) verwendet.

2.2 Zelllinie

Für die Experimente wurde ein Zellkulturmodell humaner SV-40-immortalisierter Hornhautepithelzellen verwendet. Dabei handelte es sich um Hornhautepithelzellen, die von einer 49-jährigen Frau mit Sinus-maxillaris-Karzinom stammen und mit einem rekombinanten SV-40-Adenovirus zur Immortalisierung infiziert wurden. Ihre charakteristischen Eigenschaften sind hohe Passagezahlen, Stabilität und folglich reproduzierbares Wachstumsverhalten. Die Zelllinie hat weitestgehend identische Eigenschaften wie ursprüngliche Cornealzellen. Charakteristisch sind die morphologische Ausbildung eines pflastersteinähnlichen Zellreliefs, Formation von Desmosomen, die Ausbildung von Mikrovilli und Expression von hornhautspezifischem 64-kDa Zytokeratin. Die Zelllinie wurde bei 37° C, 95 % O_2 und 5 % CO_2 kultiviert und das Kulturmedium alle 48 bis 72 Stunden ausgetauscht [1].

2.3 Kulturmedien und -zusätze

Für die Untersuchungen wurden vier verschiedene Kulturmedien verwendet. Zur Vorbereitung der Versuche wurde anfangs ein sogenanntes „**Anzuchtmedium**“ benutzt, das der Zusammensetzung des vom Erstbeschreiber der Zelllinie optimierten Mediums entsprach.

Um definierte Ausgangsbedingungen für die Versuche zu erzielen, wurde jede Zellkultur mit einem vollständig definierten Medium mit Wachstumsfaktorzusätzen - nachfolgend „**Definiertes Wachstumsmedium**“ genannt - für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden alle Zellen für 24 Stunden mit einem Medium ohne Serum oder Wachstumsfaktorzusatz - im Folgenden „**Minimalmedium**“ genannt - inkubiert. Bei der Untersuchung der Differenzierung der Zellen wurde als Kontrolle ein Medium verwendet, welches die Ausdifferenzierung der kornealen Epithelzellen durch einen angehobenen Gehalt an Kalzium unterstützt und im weiteren „**Differenzierungsmedium**“ genannt wird [8, 49].

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien angegeben:

Anzuchtmedium:

206 ml Ham´s F12, 206 ml MEM mit 25 mM Hepes Puffer, 25 ml fetales Rinderserum, 5 ml Antibiotikum und Antimykotikum (100X) Liquid: 10000 Einheiten Penizillin, 25 µg Ampthoterizin, 10 mg Streptomyzin, 50 µl EGF, 1 ml Insulin, 50 µl Cholera Toxin.

Definiertes Wachstumsmedium:

500 ml Definiertes Keratinocyte Serum Free Medium (KSFM), Wachstumsfaktorzusatz Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), 5 ml Antibiotikum und Antimykotikum (100X) liquid.

Minimalmedium:

500 ml Definiertes KSFM, 1 % Serum-Albumin, 5 ml Antibiotikum und Antimykotikum (100X) Liquid.

Differenzierungsmedium:

500 ml Definiertes KSFM, 2 mM CaCl, 5 ml Antibiotikum und Antimykotikum (100X) Liquid.

2.4 Geräte und Chemikalien

Die Geräte und Substanzen, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, sind im Anhang aufgelistet und mit Hersteller und Herstellungsort versehen.

2.5 Zellkultur, -passage und -zählung

Zellkultur

Zum Auftauen von in Kryoröhrchen mit 5 % zugesetztem Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefrorenen Zellen, wurde das Gefäß aus dem Flüssigstickstoffbehälter entnommen, für eine Minute bei Raumtemperatur erwärmt und dann mit 37° C warmem Wasser überspült, bis die Zellen eine physiologische Temperatur erreichten. Der Deckel des Gefäßes wurde vor Öffnung mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in ein

Falcon-Röhrchen pipettiert und dann langsam fünf bis sechs Milliliter Anzuchtmedium hinzugegeben. Bei 138 G wurden die Zellen für fünf Minuten zentrifugiert, das Medium abpipettiert und die Zellen wieder in Anzuchtmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt und die Zellen dann in 50 ml Anzuchtmedium kultiviert.

Zellpassage

Das Kulturmedium wurde von der Zellkulturflasche abpipettiert und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Fünf bis zehn Milliliter zehnfach konzentrierte Trypsin-EDTA-Lösung wurden auf den Zellrasen pipettiert und zirka zwei bis fünf Minuten inkubiert, bis die Zellen sich aus dem Verband lösten. Trypsin spaltet Arginin und Lysin. EDTA bindet die zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+}, die zellbindende Membranproteine stabilisieren. Durch das Phasenkontrastmikroskop wurde die Lösung der Zellen aus dem Verband überprüft. Durch Zugabe von 10 ml Anzuchtmedium wurde die Neutralisierung der Trypsin-EDTA-Lösung erreicht. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 138 G für fünf Minuten und die Resuspension mit Anzuchtmedium. Der Vorgang wurde wiederholt und die Zellen auf sterile Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:3 verteilt.

Zellzählung

Die Zellen wurden wie oben genannt passagiert, aber nicht auf Zellkulturgefäße verteilt, sondern mit 5 ml Anzuchtmedium versetzt. 50 µl Trypan Blau wurden mit 50 µl Zellsuspension gemischt. Das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer wurde durch Atemluft befeuchtet, sodass dieses sicher auf der Kammer haftete. Die Zählkammer wurde mit der Zellsuspension befüllt und anschließend die ungefärbten Zellen gezählt. Abgestorbene Zellen färbten sich aufgrund ihrer permeabilisierten Zellmembran blau und wurden von der Zählung ausgeschlossen. Die Gesamtzahl der vitalen Zellen in beiden Zählkammern wurde mit 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

2.6 Blutbild und Thrombozytenzählung in Blutpräparaten

Von jedem Spender wurde ein Blutbild mittels Blutbildautomaten GenS Haematology Analizer (Fa. Beckmann Coulter, Krefeld) erstellt. Um den Thrombozytengehalt der verschiedenen Produkte zu messen, wurden Plasma- und Serumpräparate von fünf Probanden bei 100 (853 U/Min.), 300 (1477 U/Min.), 1000 (2697 U/Min.) und 3000 G

(4671 U/Min.) zentrifugiert. Im Überstand erfolgte eine erneute Messung des Thrombozytengehaltes mittels Blutbildautomat.

2.7 Biochemische Charakterisierung der Blutpräparate

Neben dem Gesamtprotein wurden in jeder Testlösung die Konzentration von Fibronektin, EGF, TGF-β_2, PDGF und Vitamin A und E bestimmt.

2.7.1 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Der Protein-Assay nach Bradford basiert auf einer Änderung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G-250 zwischen 465-595 nm bei Bindung des Farbstoffes an Proteine. Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte mit einem Testkit von Bio-Rad (München). Die Proben wurden zur Messung mit einem mitgelieferten Probenpuffer (Phosphorsäure, Methanol) verdünnt und mit dem Farbreagenz gemischt. Die aus der Farbänderung errechnete Proteinkonzentration wurde mit dem Plattenspektrophotometer „FLUOstar OPTIMA“ bei 595 nm ausgelesen. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Standardreihen (Lyophilisierte Gammaglobulinpräparate aus Rinderplasma) von 0,2 bis 1,4 mg/ml wurden in Duplikaten, die Proben in Triplikaten gemessen.

2.7.2 Quantifizierung von Wachstumsfaktoren und Fibronektin mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Wachstumsfaktoren EGF, PDGF-AB und TGF-β_2 wurden nach den Vorgaben der Testhersteller mit Hilfe der ELISA-Technik quantifiziert, bei der spezifische monoklonale Antikörper für das jeweilige Protein auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte immobilisiert waren (verwendete ELISA siehe Anhang). Jeweils 200 µl Standard und Proben wurden in Triplikaten aufpipettiert und nach der jeweils empfohlenen Inkubationszeit sämtliche ungebundenen Substanzen ausgewaschen. Nach Inkubation mit einem enzymgebundenen, polyklonalen, spezifischen sekundären Antikörper wurden alle ungebundenen Zweitantikörper ausgewaschen, die Substratlösung des jeweiligen ELISA-Kits zugegeben, die enzyminduzierte Farbänderung bei einer Wellenlänge von 450 nm (ELISA-Reader,

Rosys Anthos 2001, Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Austria) quantifiziert und die Konzentration der Proben mit Hilfe der Standardkurve bestimmt.

Bei dem kompetitiven Fibronektin-ELISA, war die Intensität der Farbe umgekehrt proportional zum Gehalt an Fibronektin in der Probe. Dieses Testprinzip beruht auf einer Signalabschwächung, hervorgerufen durch die konkurrenzbedingte Verdrängung des enzymmarkierten Analyten von den Bindungsstellen des Antikörpers durch das Fibronektin aus der Probe. Die resultierende Farbintensität ist damit umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten (Chemicon international, Temecula, USA). In diesem Testsystem wird ein Fibronektin-Antikörper in definierter Menge immobilisiert und Fibronektin enzymmarkiert. Die Probe mit unbekanntem Fibronektingehalt wird zusammen mit einer definierten Menge enzymmarkiertem Analyt in die Mikrotiterplattenvertiefungen pipettiert. Während der Inkubation konkurrieren freies und markiertes Antigen um die Bindungsstellen am Antikörper. Als nächster Schritt folgt die Abtrennung des ungebundenen Antigens. Durch Zugabe eines enzymspezifischen Substrates kommt es zu einer Farbreaktion. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers und der Messbereich lag bei 450 nm. Die Standardreihe und die Proben wurden in Duplikaten gemessen.

2.7.3 Bestimmung von Retinol und Tokopherol mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Retinol (Vitamin A) und Tokopherol (Vitamin E) wurden mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), einer leistungsfähigen Trennmethode, bestimmt. Die Vorbereitung von Standards, Proben und Kontrollen erfolgte nach folgendem Schema:

Standards	Proben und Kontrollen
100 µl Standard 1 - 5	200 µl Probe / Kontrolle
+ 200 µl Poolserum	+ 100 µl Ethanol
+ 100 µl interner Standard	+ 100 µl interner Standard
mischen, Zugabe von 500 µl Hexan,	mischen, Zugabe von 500 µl Hexan,
erneut mischen	erneut mischen

Jede Lösung wurde für 2 Minuten bei 7000 U/Min. zentrifugiert und die obere Phase zum späteren Eindampfen abpipettiert. Zur unteren Phase wurden 500 µl Hexan zugegeben. Es folgte eine zweite Zentrifugation, erneutes Abpipettieren der oberen Phase und dann Hinzugabe zum 1. Extrakt. Die gesamte obere Phase wurde nun bei 40º C für 20 Minuten bei einem Druck von 0,2 psi eingedampft, anschließend erfolgte die Lösung in 250 µl Aceton, mischen und 10-minütige Inkubation im Ultraschallbad, anschließend Zentrifugation für 2 Minuten bei 7000 U/Min. Als mobile Phase diente eine Ammoniumacetat/Methanol/Acetonitril-Lösung. Zur Herstellung wurden 3,85 g Ammoniumacetat in 1 Liter Methanol/Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 80:20 gelöst. Als Chromatographiesäule (ProntoSIL 120-3-C18 H) kam eine Standard C18-Phase zur Verwendung, welche auf einem hochreinen Kieselgel basiert (BISCHOFF, Leonberg). Der Druck lag bei ca. 180 bar, der Flow betrug 0,6 ml/min. Die Serum- und Plasmaproben wurden im Wellenlängenbereich von 190-800 nm gemessen (Diodenarray-Detektor L-4500, Hochleistungs-UV/VIS-Detektor). Vitamin A- und E-Kontrollen (Fa. Chromsystems, 0036, 0037) sowie Standards wurden mitgeführt (HPLC-Anlage, siehe Anhang).

2.8 Evaluation von Proliferation, Migration und Differenzierung im Zellkulturmodell

Für die Experimente wurden die Kornealzellen mit einer Dichte von 15.000 Zellen pro Vertiefung mit Anzuchtmedium kultiviert. Für die Proliferation und Migration wurden 96-Lochplatten, für den Migrationsversuch 6-Lochplatten verwendet. Die Zellen wurden für mindestens 24 Stunden mit definiertem Wachstumsmedium inkubiert. Wenn eine Zellkonfluenz von zirka 60 % erreicht wurde, wurde das definierte Wachstumsmedium verworfen, der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und 24 Stunden mit Minimalmedium inkubiert. Für jeden Versuch wurden eine negative (Benzalkoniumchlorid) und positive Kontrolle (definiertes Wachstumsmedium) in Triplikaten mitgeführt. Die Vorbereitungen der Zellkulturen waren für alle Zellkulturversuche gleich.

Der intrazelluläre Adenosintriphosphat (ATP) -Gehalt als Maß für die Zellproliferation, wurde mittels Luziferin-Luziferase basiertem ATP-Biolumineszenz-Assay nach Angaben des Herstellers bestimmt (TCA-Lite, Fa. DCS, Hamburg). Diese Methode macht es sich

zu Nutze, dass alle lebenden Zellen ATP als Energiequelle für Stoffwechselprodukte nutzen. Der ATP-Gehalt der Zellen in den Lochvertiefungen ist ein Marker für das Zellwachstum, welcher eng mit der Zellenanzahl korreliert. Daher ist die Bestimmung von ATP eine geeignete Methode, um die Proliferation von Zellen in unterschiedlichen Proben zu vergleichen [5, 6]. Bei dem ATP-Biolumineszenzverfahren wird der zelluläre ATP-Gehalt quantitativ bestimmt. Durch den Substrat-Enzym-Komplex Luziferin-Luziferase wird das ATP der Zellen enzymatisch in Lichtenergie umgewandelt und durch Biolumineszenz bestimmt, da zwischen Lichtintensität und ATP-Gehalt eine quantitative Beziehung besteht.

Im ersten Schritt werden ATP und Luziferin durch das Enzym Luziferase in Anwesenheit von Magnesium in den Luziferin-Luziferase-AMP-Komplex und Pyrophosphat umgebaut. Im zweiten Schritt entsteht durch Sauerstoff Oxyluziferin-Luziferase-AMP. Dieser Substrat-Enzymkomplex zerfällt zu Oxyluziferin, CO_2 und Luziferase; dabei wird Licht frei und die Lichtintensität ist proportional zur Menge des ATP [18].

Hierzu wurden die zu messenden Kulturen zweimal mit PBS gewaschen, 200 µl PBS hinzugegeben und das intrazelluläre ATP durch Zugabe von 50 µl Zellextraktionsreagenz und 20-minütige Inkubation extrahiert. Nach 1:1-Mischung von Zelllysat und Luzeferin-Luziferase-Reagenz wurde der ATP Gehalt mit dem Luminometer „Rosys Anthos Lucy 3 Version 1.2“ (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Österreich) quantifiziert. Eine ATP-Standardkurve mit einer 250-ng/ml-Stammlösung und anschließender 1:3-Verdünnungsreihe wurde für jede Messung mitgeführt.

2.8.1 Einfluss von Zitrat auf den relativen ATP-Gehalt der Zellen

In einem Vorversuch sollte geklärt werden, ob der zur Gerinnungsinhibition eingesetzte Zitratpuffer, der zur Antikoagulation des Vollblutes vor Plasmagewinnung verwendet wurde, sich toxisch auf das Zellwachstum auswirkt. Dabei wurde der Zitratpuffer unverdünnt bzw. mit 0,9 % NaCl, BSS und Minimalmedium auf 3,125, 6,25, 12,5, 25 und 50 % verdünnt und die Hornhautepithelzellen für 24 Std. in Triplikaten einschließlich positiver und negativer Kontrolle inkubiert.

2.8.2 Messung der Zellproliferation in Dosis- und Zeit-Wirkungsexperimenten mittels ATP-Assay

Als Maß für die Proliferation wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt der Zellkulturen mit dem o. g. auf Luziferin-Luziferase basierenden Lumineszenz-Assay bestimmt [18, 46]. Hierzu wurden in 96-Lochplatten 3000 Zellen/Loch 24 Stunden mit serumhaltigem Anzuchtmedium und weitere 24 Stunden mit serumfreiem Minimalmedium kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte 200 µl eines Testpräparates oder einer Kontrolle in Triplikaten gegeben. Als negative Kontrolle (maximale Wachstumshemmung) diente eine 1%ige Benzalkoniumchlorid-Lösung, als positive Kontrolle (maximale Wachstumsförderung) definiertes Wachstumsmedium. Benzalkoniumchlorid ist ein Konservierungsmittel und besitzt stark toxische Eigenschaften, da es als starkes kationisches Detergenz die Lipide in Zellmembranen zerstört und die Zellen permeabilisiert werden. In der Folge wird in vitro ein intakter Gewebsverband aufgelöst, und es erfolgt rasch der Verlust vollständiger Zellschichten [13, 18, 20, 22, 23, 25, 46, 48].

In Zeit-Wirkungsexperimenten wurden die Zellen über 0, 12, 24, 48, 96 und 144 Stunden mit einer 20%igen Probenlösung nach Verdünnung mit NaCl, BSS oder Minimalmedium inkubiert. In Dosis-Wirkungsexperimenten wurden die Zellen für 24 Stunden mit unverdünnten (100 %) und in 0.9 % NaCl bzw. BSS zu 3,125, 6,25, 12,5, 25 und 50 % verdünnten Testprodukten inkubiert. Anschließend wurde das Testpräparat entfernt, die Kulturen zweimal mit PBS gewaschen, 200 µl PBS zugegeben und das intrazelluläre ATP durch 20-minütige Zugabe von 50 µl Zellextraktionsreagenz (DCS Innovative, Hamburg) extrahiert und bis zur Messung eingefroren. Nach Mischung von Zelllysat und Luziferin-Luziferase Reagenz (DCS Innovative, Hamburg) im Verhältnis 1:1 wurde der ATP-Gehalt mit dem Luminometer (Rosys Anthos Lucy 3, Version 1.2) quantifiziert. Eine ATP-Standardkurve mit einer 250 ng/ml Stammlösung und anschließender 1:3 Verdünnungsreihe bis auf 0,012 ng/ml wurde für jede Messung mitgeführt.

2.8.3 Messung der Zellmigration im Kolonie-Dispersions-Versuch

Anhand eines Kolonie-Dispersions-Assays wurde die Migration der Epithelzellen während der Inkubation mit den verschiedenen Testlösungen quantifiziert. Hierzu wurden je 700 µl einer 0,01%igen Kollagen I-Lösung in die Vertiefungen einer 6-Loch-Zellkulturplatte (57,6 µg/ 9,6 cm^2) gegeben und diese unter einer sterilen Werkbank getrocknet. Dann wurden je 3 Silikonzylinder (Viva Science, Göttingen) fest auf den Boden der Vertiefung gepresst und je 10.000 Zellen mit 150 µl Kulturmedium in einen Silikonzylinder eingebracht und bis zur Zellkonfluenz inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch 24-stündige Inkubation in Anzuchtmedium mit Zusatz von 100 µM Hydroxyurea inhibiert, um die weitere DNA-Synthese der Zellen zu unterbinden und die reine Migration der Zellen beurteilen zu können [8, 25, 43, 47].

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS folgte die Inkubation der Zellen für weitere 24 Stunden mit Minimalmedium. Danach wurden die Silikonzylinder entfernt, jede Kultur dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen 1:4 mit Testlösung (Serum 500/3000 G oder Plasma 500/3000 G) mit Minimalmedium verdünnt. Als Verdünnungslösungen wurden BSS oder 0,9 % NaCl verwendet. Die Inkubation mit den verdünnten Testlösungen erfolgte für 0, 12, 24, 48, 96 und 144 Stunden. Dann wurden die Zellen mit 90%igem Methanol für 10 Min. fixiert und für 30 Min. mit Hämatoxylin gefärbt. Die Fläche des konfluenten Zellrasens wurde mit einer definierten Vergrößerung digital fotografiert (Digital Still Camera, Sony DSC-S75) und mit Hilfe des Programms UTHSCSA Image Tool, Version 2.00 alpha vermessen. Die Versuche wurden in Triplikaten mit Plasma und Serum von 2 Blutspendern durchgeführt (Abb.3).

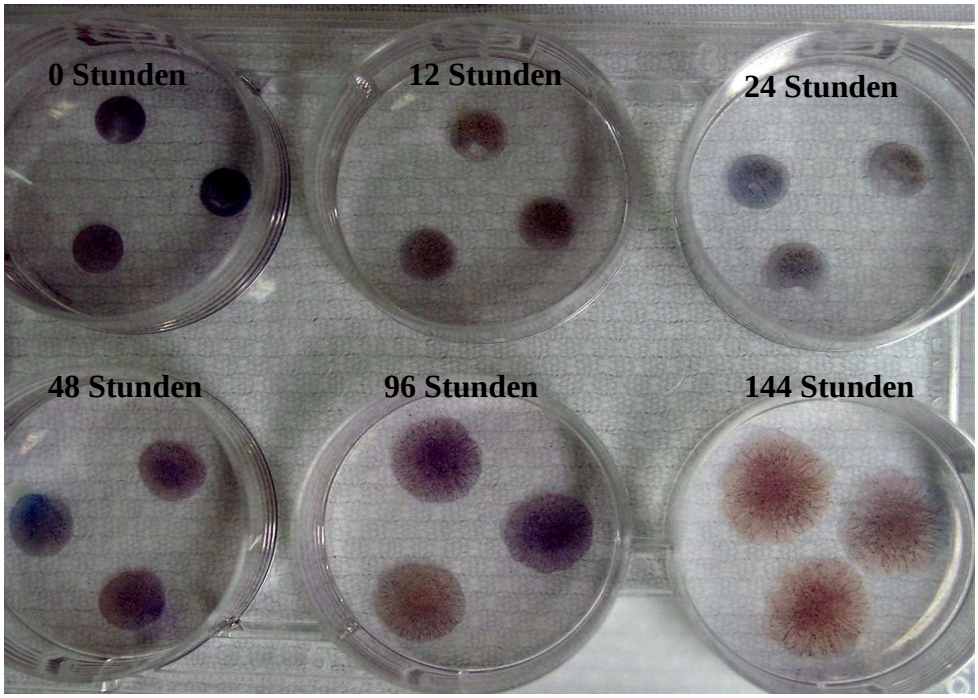


Abb. 3 6-Lochplatte eines Migrationsversuches. Zellkolonieflächenausdehnung nach Inkubation mit verdünntem Serum und anschließender Fixierung und Färbung mit Hämatoxylin.

2.8.4 Bestimmung der Zelldifferenzierung mittels Rasterelektronenmikroskopie und Immunohistochemie

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde die Oberflächenstruktur der Kornealzellen hinsichtlich der typischen Merkmale differenzierter Hornhautepithelzellen untersucht [1]. Hierzu wurden 10^4 Zellen auf Thermanox-Zellkultureinsätzen für 48 Stunden mit Anzuchtmedium und dann für 48 Std. in 1 % BAC (negative Kontrolle), definiertem Wachstumsmedium (positive Kontrolle) oder unverdünnter (100 %) Testlösung inkubiert. Die Testexposition wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS beendet und die Zellen anschließend für 24 Stunden mit Fixationslösung nach Monte-Gracia-Dei (2,5 % Gluteralaldehyd in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer bei pH 7,4) fixiert, in aufsteigender Acetonreihe entwässert und einer Kritischen-Punkt-Trocknung und abschließenden Platin-Palladium-Beschichtung unterzogen. Die Untersuchung des morphologischen Wachstumsverhaltens sowie der zellulären Oberflächenbeschaffenheit erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop SEM 505 (Fa. Phillips, Eindhoven, Holland) bei einer

Spannung von 10 bis 15 kV. Die Befunde wurden auf APX 100 Filmen (Agfa) dokumentiert.

Die Bewertung der Differenzierung der Zellen umfasste zusätzlich die immunhistochemische Untersuchung von Zytokeratin-3. Zytokeratin-3 wird als Marker von differenzierten Hornhautepithelzellen, nicht aber von undifferenzierten Zellen des Bindehautepithels exprimiert [11].

Die Bindung eines nicht markierten Primärantikörpers am Zielantigen wurde über einen enzymmarkierten Sekundärantiköper entsprechend der Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphathase Methode (**APAAP**-Methode) nachgewiesen.

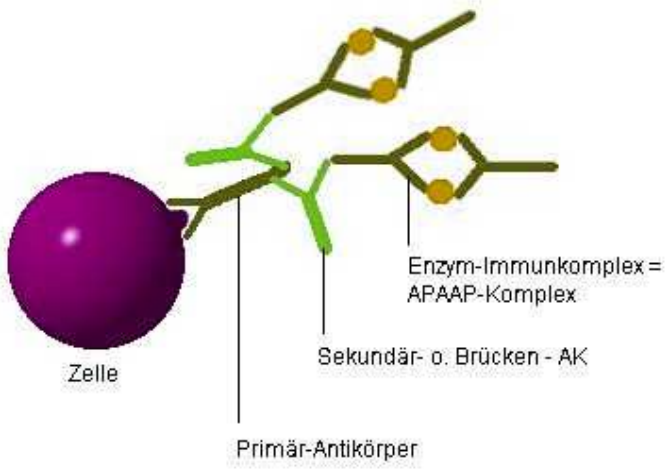


Abb. 4 Schematische Darstellung des Enzym-anti-Enzym-Komplexes bei der APAAP-Methode zur Darstellung der Differenzierung der Zellen mit Zytokeratin-3.

Hierbei wird ein Brückenantikörper verwendet, der den Primärantikörper mit dem APAAP-Komplex verbindet. Dieser Komplex wird aus einem Enzym (APAAP) und einem Antikörper gebildet, der gegen dieses Enzym gerichtet ist. Der primäre und der gegen das Enzym gerichtete Antikörper stammen von der gleichen Tierart (hier Maus). Der Brückenantikörper ist gegen Immunglobuline dieser Tierart gerichtet. Der an das Enzym gebundene, nicht markierte Primärantikörper, wurde mit dem Farbstoff Vektor-Rot nachgewiesen (Abb. 4). Diese Methode hat eine hohe Sensitivität, aber den Nachteil, dass der Farbstoff schnell verblasst, der Versuch schnell ausgewertet werden muss und die gefärbten Präparate nicht archivierbar sind.

Die Proben wurden in 20%iger Konzentration mit BSS, NaCL und Minimalmedium verdünnt und in Triplikaten aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über 72 Stunden. PBS, Minimal-, Anzucht- und Differenzierungsmedium wurden als Kontrollen mitgeführt. Die Auswertung des Versuches erfolgte durch Zählung der rot gefärbten Zellen in je 5 Feldern jeder Vertiefung im Blickfeld des Phasenkontrastmikroskopes bei 20-facher Vergrößerung. Erst wurden alle Zellen jedes Feldes insgesamt, dann der Teil der Zytokeratin-3-positiven Zellen gezählt. Zur Arbeitserleichterung wurde ein Okular (E-Pl 10x/20 Br der Firma Zeiss) mit Gitternetzlinien benutzt (Abb. 5).

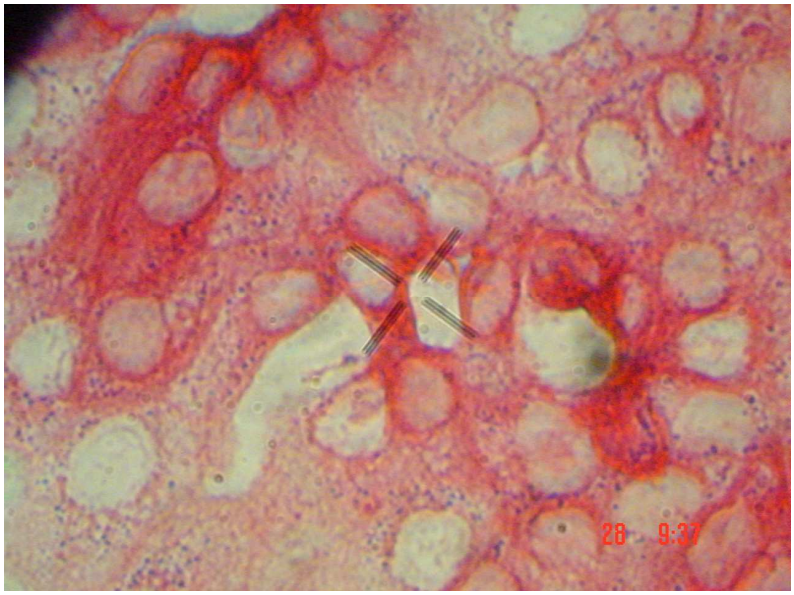


Abb. 5 Blick durch das Phasenkontrastmikroskop bei der Zählung Zytokeratin-3-positiver Zellen bei 40-facher Vergrößerung.

2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS für Windows, Version 11.0.1 (15. Nov. 2001), Fa. SPSS.Inc verwendet. Die nicht-parametrischen Daten der verschiedenen Blutprodukte wurden mit Hilfe des Wilcoxon signed-rank Test verglichen. Zur Berechnung der Korrelationen wurde der Spearman-bivariat-Test eingesetzt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert. Es fand eine statistische Beratung durch das Institut für medizinische Biometrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck statt.

3 Ergebnisse

3.1 Blutbild und Thrombozytenzählung in Blutpräparaten

Bei zehn Patienten wurde eine Untersuchung des Blutbildes durchgeführt, welches sowohl die Bestimmung von Erythrozyten- und Thrombozytenzahl, als auch von Hämoglobin- und Hämatokritwert umfasste. Signifikante Abweichungen der Proben vom Normbereich konnten nicht nachgewiesen werden (Tab. 2).

N=10	Erythrozyten	Hämoglobin	Hämatokrit	Thrombozyten
EINHEIT	/pl	g/l	% x 0,01	/nl
MAX	5,05	160	0,46	338
MIN	3,88	122	0,37	150
STABW	0,39	11,38	0,03	57,12
NORMWERTE	4 - 5,5	120 - 180	0,38 - 0,52	150 - 400
MITTELWERT	**4,4**	**139**	**0,39**	**250,3**

Tab. 2 Zusammenfassung der ermittelten Blutwerte von zehn Probanden. Normwerte des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck, Zentrallabor.

Ferner wurde der Thrombozytengehalt der Serum- und Plasmapräparate nach zehnminütiger Zentrifugation bei 100 G (853 U/Min.), 300 G (1477 U/Min.), 1000 G (2697 U/Min.) und 3000 G (4671 U/Min.) an einer Stichprobe von fünf Probanden gemessen, um den Einfluss der Zentrifugalkraft auf den Thrombozytengehalt der einzelnen Präparate zu untersuchen (Tab. 3).

Plasmapräparate enthielten signifikant mehr Thrombozyten als Serumpräparate (2,2 x 10^{-3}). Bei der Zentrifugation von Plasma wurde die Thrombozytenzahl signifikant mit Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit erniedrigt (p= 0,0013 für 100 G versus 3000 G). Bei Serumpräparaten ist die Thrombozytenzahl nach der Koagulation erwartungsgemäß gegenüber Plasma stark reduziert, sodass ihre Konzentration im Serum durch Erhöhung der Zentrifugalkraft (100 G bis 3000 G) nicht signifikant gesenkt (p= 0,363 für 100 versus 3000 G) wurde.

N=10	Plasma 100 G	Plasma 300 G	Plasma 1000 G	Plasma 3000 G	Serum 100 G	Serum 300 G	Serum 1000 G	Serum 3000 G
MAX	115	35	18	7	33	11	8	4
MIN	40	19	10	4	1	1	1	1
STABW	31,3	6,6	3,2	1,3	13,9	4	2,8	1,1
MITTELWERT	**72,8**	**26,2**	**13,4**	**5,2**	**8,4**	**4,2**	**3,4**	**2,4**
Plasma signifikant > Serum ($p= 2,2 \times 10^{-3}$) **P 100 G signifikant > S 100 G ($p= 2,9 \times 10^{-3}$)** **P 100 G signifikant > S 3000 G ($p= 1 \times 10^{-3}$)** **P 100 G signifikant > P 3000 G ($p= 1,3 \times 10^{-3}$)**								

Tab. 3 Ermittelter Thrombozytengehalt in 1000 /µl von fünf Probanden in Plasma- und Serumpräparaten, jeweils zentrifugiert bei 100, 300, 1000 und 3000 G.

3.2 Biochemischer Charakter der Blutpräparate

3.2.1 Gesamtprotein

Die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford zeigte, dass Plasma (3000 G) den höchsten und Plasma (500 G) den niedrigsten Proteingehalt besaß. Blutprodukte, zentrifugiert bei 3000 G, hatten insgesamt einen höheren Proteingehalt als solche, die mit 500 G zentrifugiert wurden. Auffallend niedriger als in den restlichen Produkten war die Proteinkonzentration in Plasma (500 G), (Tab. 4).

N=10	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
MAX	490,4	641	597,5	604,9
MIN	415,9	483	369	418,1
STABW	26,2	42,5	57,9	59,4
MITTELWERT	**440,6**	**554,8**	**511,0**	**541,6**
S 3000 G signifikant > S 500 G ($p= 2,59 \times 10^{-2}$) **P 3000 G signifikant > P 500 G ($p= 5,06 \times 10^{-3}$)** **S 500 G signifikant > P 500 G ($p= 9,3 \times 10^{-3}$)**				

Tab. 4 Gesamtproteinkonzentration bei zehn Probanden in µg/ml nach Bradford.

3.2.2 EGF

Die EGF-Konzentration war in Serum (3000 G) am höchsten, in Plasma (3000 G) deutlich niedriger als in den übrigen Produkten. Serumpräparate hatten eine höhere EGF-Konzentration als Plasmapräparate (Tab. 5).

N=10	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
MAX	0,5	0,01	1,2	1,3
MIN	0,1	0,003	0,2	0,1
STABW	0,1	0,003	0,3	0,4
MITTELWERT	**0,2**	**0,007**	**0,6**	**0,7**
Serum signifikant > Plasma ($p= 1,03 \times 10^{-4}$) P 500 G signifikant > P 3000 G ($p= 5,06 \times 10^{-3}$) S 500 G signifikant > P 3000 G ($p= 5,4x\ 10^{-4}$) S 3000 G signifikant > P 3000 G ($p= 5,1 \times 10^{-3}$)				

Tab. 5 EGF-Konzentration bei zehn Probanden in ng/ml.

3.2.3 PDGF-AB

Serum (3000 G) hatte den höchsten und Plasma (3000 G) den niedrigsten PDGF-AB-Gehalt. Die Konzentration von PDGF-AB war in Plasma (3000 G) auffallend niedrig, Serum (3000 G, 500 G) und Plasma (500 G) hatten einen signifikant höheren PDGF-Gehalt als Plasma (3000 G), (Tab. 6).

N=10	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
MAX	29,3	3,5	21,0	22,2
MIN	6,0	0,3	6,5	8,7
STABW	7,3	1,0	5,1	4,8
MITTELWERT	**14,0**	**1,1**	**14,9**	**15,0**
P 500 G signifikant > P 3000 G ($p= 5,06 \times 10^{-3}$) S 3000 G signifikant > P 3000 G ($p= 5,06 \times 10^{-3}$) S 500 G signifikant > P 3000 G ($p= 2,6 \times 10^{-3}$)				

Tab. 6 PDGF-AB-Konzentration bei zehn Probanden in ng/ml.

3.2.4 TGF-β_2

Der TGF-β_2-Gehalt war in Plasma (500 G) am höchsten und in Plasma (3000 G) am niedrigsten. Plasma (3000 G) hatte signifikant weniger TGF-β_2 als Plasma (500 G) und Serum (500 und 3000 G), (Tab. 7).

N=10	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
MAX	52,6	8,8	28,8	26,8
MIN	19,3	4,2	11,8	10,1
STABW	12,1	1,5	6,1	4,9
MITTELWERT	**36,5**	**5,7**	**21,1**	**13,3**
P 500 G signifikant > P 3000 G ($p= 5,06 \times 10^{-3}$) S 500 G signifikant > P 3000 G ($p= 8,55 \times 10^{-3}$) S 3000 G signifikant > P 3000 G ($p= 5,06 \times 10^{-3}$)				

Tab. 7 TGF-β_2- Konzentration bei zehn Probanden in ng/ml.

3.2.5 Fibronektin

Der Fibronektingehalt war in den Serumpräparaten am höchsten und in Plasma (3000 G) am niedrigsten. Bei diesem Protein ergaben sich im Gegensatz zu den übrigen untersuchten *keine* signifikanten Unterschiede untereinander (Tab. 8).

N=10	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
MAX	261,4	222,8	277,6	328,0
MIN	57,7	63,6	96,2	86,4
STABW	59,8	52,7	64,6	88,5
MITTELWERT	**153,0**	**138,9**	**181,5**	**177,6**

Tab. 8 Fibronektin-Konzentration bei zehn Probanden in µg/ml.

3.2.6 Retinol und Tokopherol

Retinol (Vitamin A)

Für Vitamin A wurde die höchste Konzentration in Serumpräparaten und die niedrigste in Plasmapräparaten gemessen. Serumpräparate hatten einen signifikant höheren

Vitamin A-Gehalt als Plasmapräparate. Weder Plasma- noch Serumpräparate wiesen untereinander Unterschiede zwischen 500 G und 3000 G-Zentrifugation auf (Tab. 9).

N=10	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
MAX	3,2	3,3	4,2	4,4
MIN	2,0	2,0	2,3	2,6
STABW	0,4	0,4	0,6	0,6
MITTELWERT	**2,5**	**2,5**	**3,2**	**3,3**
S 500 G signifikant > P 500 G ($p= 5,81 \times 10^{-3}$) S 3000 G signifikant > P 3000 G ($p= 2,48 \times 10^{-3}$)				

Tab. 9 Retinol- Konzentration bei zehn Probanden in µMol/ml.

Tokopherol (Vitamin E)

Die höchste Vitamin E-Konzentration wurde in Serum (3000 G) gemessen, die niedrigste in Plasma (3000 G). Serum wies eine signifikant höhere Vitamin-E-Konzentration auf als Plasma und Serum (3000 G) mehr als Plasma (3000 G), (Tab. 10).

N=10	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
MAX	57,0	56,2	63,9	62,9
MIN	24,1	24,1	25,0	30,1
STABW	10,3	10,0	13,7	11,0
MITTELWERT	**35,3**	**34,6**	**38,8**	**40,3**
Serum signifikant > Plasma ($p= 1,54 \times 10^{-4}$) S 3000 G signifikant > P 3000 G ($p= 4,6 \times 10^{-4}$)				

Tab. 10 Tokopherol-Konzentration bei zehn Probanden in µMol/ml.

3.2.7 Einfluss des Geschlechtes auf den biochemischen Charakter der Blutpräparate

Die Fibronektin- (Serumpräparate) und Vitamin A-Konzentrationen (alle Serum- und Plasmapräparate) waren im Mittel bei Männern signifikant höher als bei Frauen. Bei der EGF-, TGF-β_2-, Gesamtprotein- und PDGF-Konzentrationsbestimmung konnten keine signifikanten Geschlechtsunterschiede festgestellt werden (Tab. 11).

Gesamtprotein	Plasma 500 G	Plasma 3000 G	Serum 500 G	Serum 3000 G
♂ gesamt	433,4	573,2	481,8	532,2
♀ gesamt	447,7	536,4	540,2	551
p=	0,42	0,19	0,11	0,64
STABW	26,2	42,5	57,9	59,4
Vitamin A				
♂ gesamt	2,8	2,8	3,6	3,7
♀ gesamt	2,3	2,2	2,8	2,9
p=	0,0287 (#)	0,017 (#)	0,005 (#)	0,015 (#)
STABW	0,4	0,4	0,6	0,6
Vitamin E				
♂ gesamt	37,8	37,4	41,9	43,1
♀ gesamt	30,4	30,2	31,6	34,5
p=	0,08	0,12	0,21	0,13
STABW	10,5	10,7	14,4	11,6
EGF				
♂ gesamt	215,4	7,3	544,3	588,6
♀ gesamt	230,8	7,1	582	824,1
p=	0,87	0,93	0,87	0,38
STABW	134,3	3,8	338,6	394,1
PDGF				
♂ gesamt	12783	1191,6	16435,2	16671,2
♀ gesamt	15172,6	1048	13396	13352,2
p=	0,63	0,83	0,37	0,30
STABW	7250,2	974,7	5074,6	4833,7
TGF- β_2				
♂ gesamt	32080	6030	22260	15180
♀ gesamt	40990	5310	19890	11430
p=	0,27	0,49	0,57	0,24
STABW	12144,1	1527,6	6095,7	4852,9
Fibronektin				
♂ gesamt	182562	156702	243060	268380
♀ gesamt	136860	110353	126436	110850
p=	0,32	0,11	0,0003 (#)	0,00031 (#)
STABW	68133,1	45488	67547,7	91669

Tab. 11 Mittelwerte der Proteine männlicher und weiblicher Seren. Signifikante Unterschiede sind mit (#) versehen. Die Einheit für Tokopherol und Retinol entspricht µmol/ml, für Fibronektin und Gesamtprotein µg/ml und für EGF, PDGF-AB und TGF-β_2 ng/ml.

3.3 Evaluation von Proliferation, Migration und Differenzierung am Zellkulturmodell

3.3.1 Einfluss von Zitrat auf die Proliferation der Zellen

Oben genannte Zitratkonzentrationen wurden in Minimalmedium, NaCl und BSS zugesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von **Minimalmedium** kein signifikanter Proliferationsunterschied der Zellen ($p= 5 \times 10^{-1}$) zwischen der höchsten und der niedrigsten zugegebenen Zitratkonzentration besteht. Zwischen 12,5%ig und 50%ig verdünnter Testlösung mit Zitratpuffer bestand ein signifikanter Proliferationsunterschied- eine höhere Zitratkonzentration beeinflusste das Zellwachstum positiv ($p= 7 \times 10^{-3}$).
Wurde zum Zitrat **NaCl** ($p= 2 \times 10^{-5}$) oder **BSS** ($p= 4{,}8 \times 10^{-2}$) zugegeben, fanden sich signifikante Unterschiede zwischen unverdünntem Zitratpuffer (100 %) und der niedrigsten (3,125 %) Zitratkonzentration. Die höhere Konzentration unterstützte das Wachstum mehr als die niedrigere. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Verwendung von Zitratpuffer zur Antikoagulation von Vollblutproben nicht zu einer Proliferationshemmung führt (Abb.6).

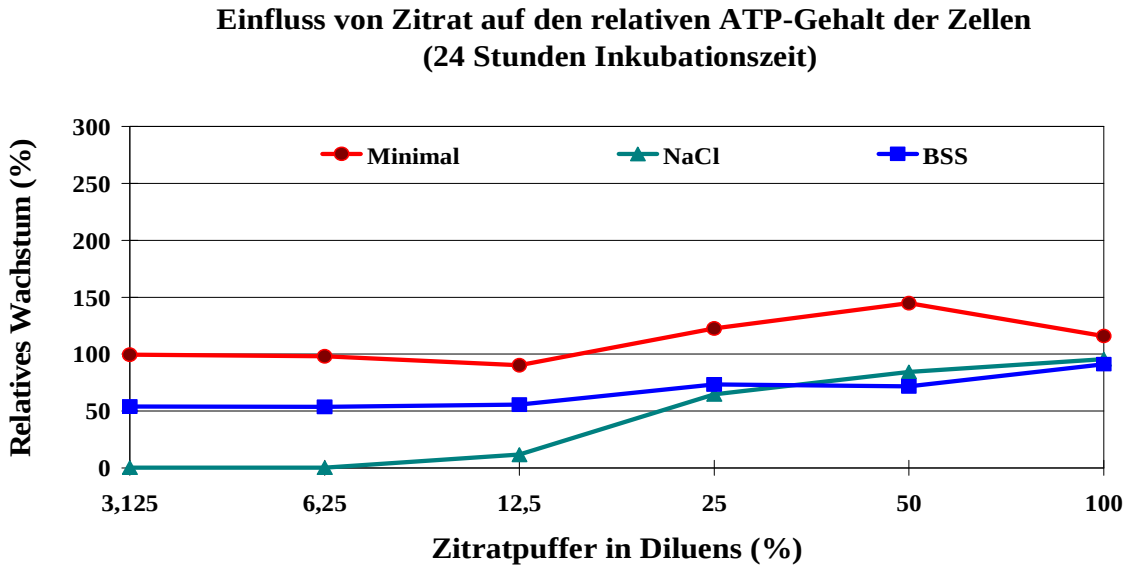
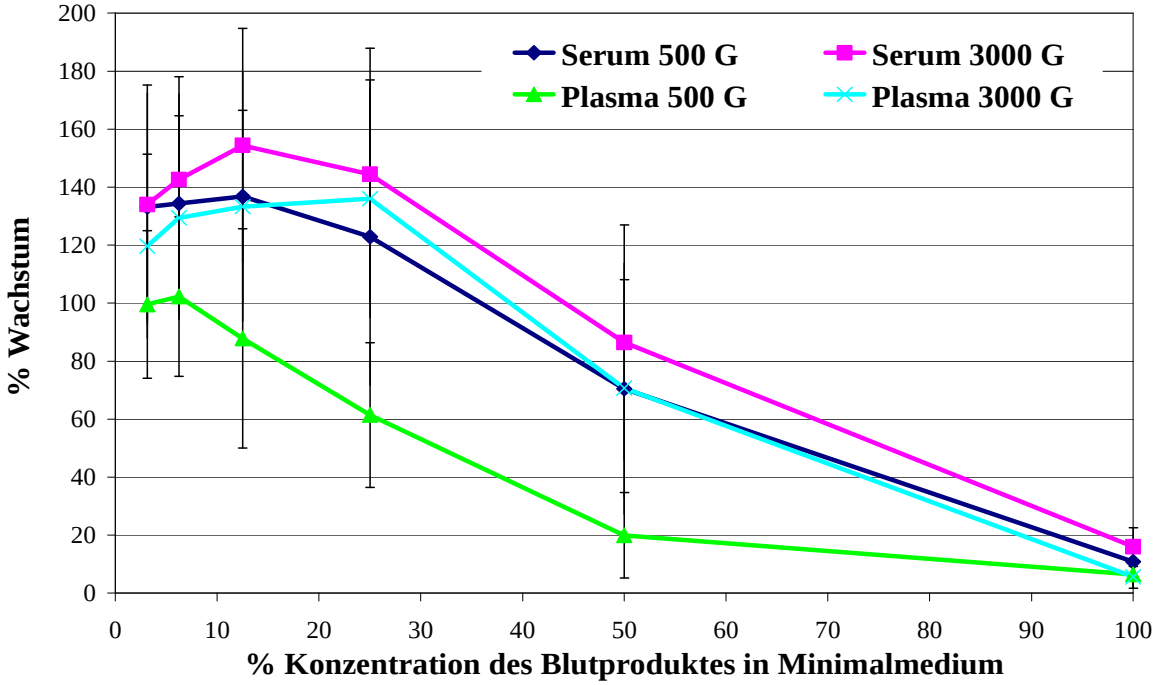


Abb. 6 Einfluss von Zitrat, verdünnt in den Diluentien Minimalmedium, NaCl und BSS, auf die Proliferation von humanen kornealen Epithelzellen nach 24-stündiger Inkubation (Dosis-Wirkungsbeziehung).

3.3.2 Proliferation

3.3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Bei diesem Versuch wurden die Diluentien Minimalmedium, NaCl und BSS verwandt. Die optimale Konzentration der mit **Minimalmedium** verdünnten Plasma- bzw. Serumproben lag bei 12,5 % Testpräparat im Verdünnungsmedium. Die stärkste Proliferation zeigten die Zellen bei Inkubation mit Serum (3000 G), die schwächste mit Plasma (500 G), (Abb. 7).
Im Vergleich zur positiven Kontrolle (definiertes Wachstumsmedium) entsprach das Zellwachstum bei 12,5 % Serumkonzentration (3000 G) maximal 154,4 %. Die Verwendung von Plasma (500 G) zeigte deutlich geringere Wachstumsraten. Ein signifikanter Geschlechtsunterschied konnte nicht nachgewiesen werden (Tab. 12).



Serum 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1,2 \times 10^{-7}$)
Serum 500 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 4,38 \times 10^{-11}$)
Plasma 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1,98 \times 10^{-11}$)

Abb. 7 Zelluläre Proliferation nach 24-stündiger Inkubation mit Serum bzw. Plasma (500 G) und Serum bzw. Plasma (3000 G), verdünnt mit **Minimalmedium**. Mittelwert von zehn Proben unter Mitführung von negativer (Benzalkoniumchlorid = 0 % Wachstum) und positiver Kontrolle (Wachstumsmedium = 100 % Wachstum).

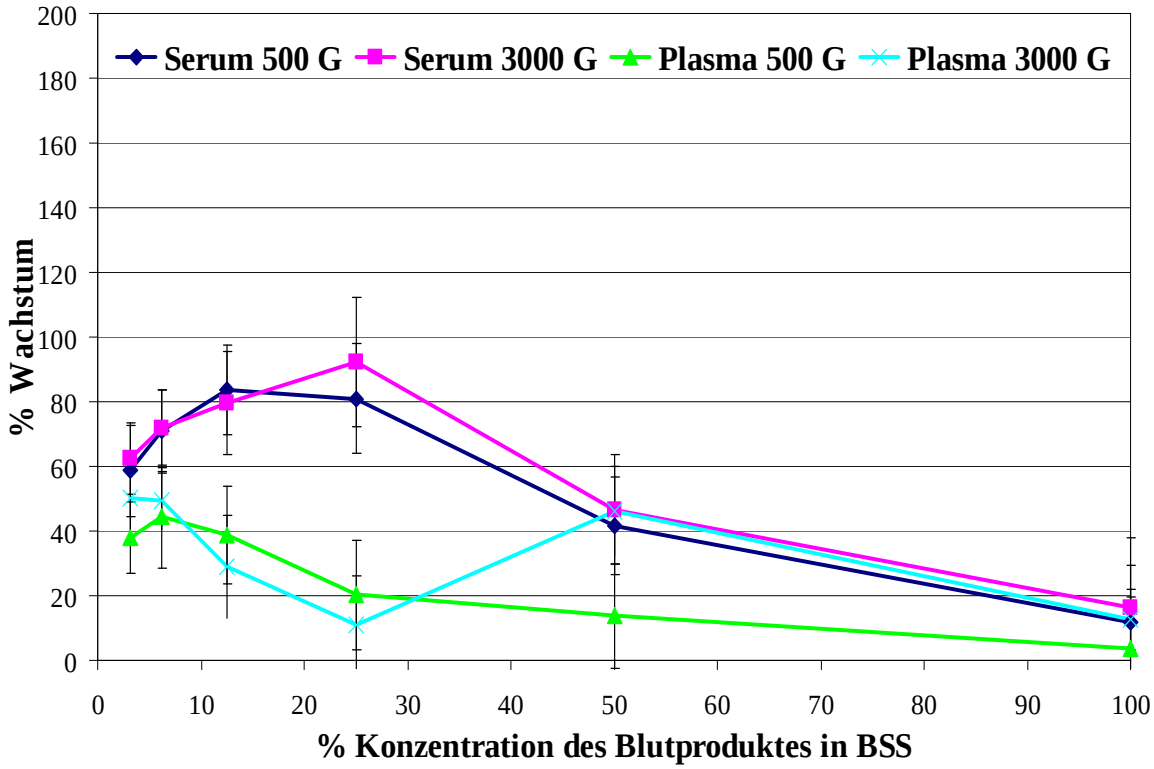
Plasma	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
500 G	♂ gesamt	109,4	102,0	89,6	60,4	17,6	8,0
	♀ gesamt	89,6	102,6	86,1	62,4	22,2	5,0
	p=	0.24	0.97	0.89	0.91	0.65	0.35
Plasma	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
3000 G	♂ gesamt	115,9	122,1	126,6	128,1	56,9	4,5
	♀ gesamt	123,4	136,9	139,9	143,9	84,6	6,8
	p=	0,73	0,54	0,56	0,58	0,26	0,33
Serum	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
500 G	♂ gesamt	130,8	133,3	130,5	117,4	61,1	9,9
	♀ gesamt	135,7	135,4	143,0	128,4	79,9	11,7
	p=	0,86	0,94	0,67	0,76	0,52	0,65
Serum	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
3000 G	♂ gesamt	111,0	113,5	123,6	108,1	54,3	11,2
	♀ gesamt	135,8	145,1	154,7	152,0	101,3	17,6
	p=	0,48	0,38	0,46	0,28	0,12	0,23

Tab. 12 Wachstumsraten (%) bezogen auf die Positivkontrolle (Wachstumsmedium) bei Inkubation der Zellen mit Seren von männlichen und weiblichen Spendern. Es bestand kein signifikanter Unterschied bei Verwendung männlicher und weiblicher Proben in der Dosis-Wirkungsbeziehung bei Verdünnung mit **Minimalmedium**.

Bei Verdünnung der Proben mit **BSS** zeigte sich bei Plasmapräparaten eine deutlich geringere Proliferation als bei Serumpräparaten. Auffällig war, dass die Zugabe von BSS in Plasma vermutlich eine Koagulationsreaktion auslöste (Abb. 8).

Abb. 8 Koagulation von Plasma bei Zugabe von BSS.

Die maximale Proliferation der Zellen war bei Verdünnung der Proben mit **BSS** geringer als bei der Verdünnung mit Minimalmedium. Die optimale Konzentration der Plasma- und Serumproben lag hier bei 25 % (Minimalmedium = 12,5 %). Serum (3000 G) hatte bei 25%iger Konzentration die stärksten Proliferationsraten und erreichte eine Zellproliferation von 92 % (154,4 % bei Verdünnung mit Minimalmedium). Bei dieser Konzentration erzielten Plasma (500 G) und (3000 G) Wachstumsraten von etwa 20 %. Ab einer 50%igen Probenkonzentration war das Zellwachstum mit Zunahme der Probenkonzentration signifikant abnehmend (Abb.9). Ein signifikanter Geschlechtsunterschied ist für keines der vier Produkte nachgewiesen worden (Tab. 13).



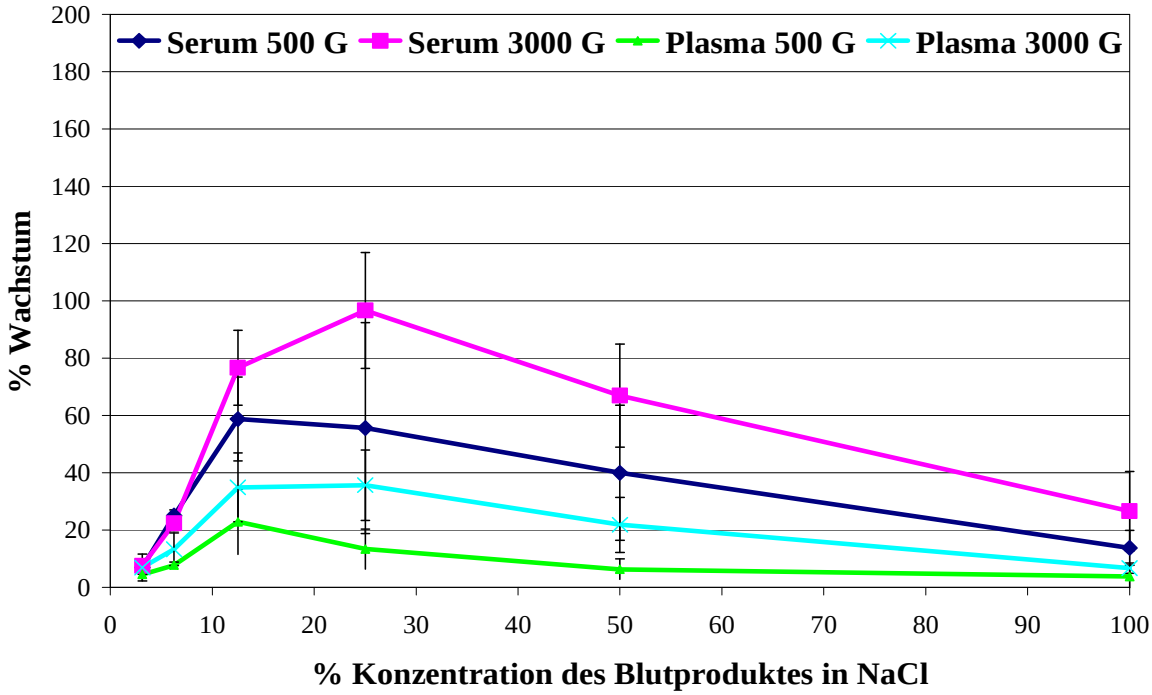
Serum 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1{,}16 \times 10^{-8}$)
Serum 500 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 4{,}65 \times 10^{-13}$)
Plasma 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1{,}49 \times 10^{-2}$)

Abb. 9 Zelluläre Proliferation nach 24-stündiger Inkubation mit Serum bzw. Plasma (500 G) und Serum bzw. Plasma (3000 G), verdünnt mit **BSS**. Mittelwert von zehn Proben unter Mitführung von negativer (Benzalkoniumchlorid = 0 % Wachstum) und positiver Kontrolle (Wachstumsmedium = 100 % Wachstum).

Plasma	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
500 G	♂ gesamt	31,09	37,73	31,02	23,59	15,35	3,07
	♀ gesamt	44,74	51,21	46,44	17,04	12,10	4,49
	p=	0,45	0,39	0,37	0,51	0,59	0,51
Plasma	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
3000 G	♂ gesamt	53,65	46,43	29,11	18,61	39,31	6,02
	♀ gesamt	46,51	52,13	28,72	3,75	52,87	19,12
	p=	0,6	0,66	0,98	0,11	0,46	0,36
Serum	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
500 G	♂ gesamt	59,35	68,41	85,38	86,55	36,53	13,85
	♀ gesamt	57,82	73,28	81,88	75,41	46,88	10,11
	p=	0,93	0,8	0,9	0,69	0,65	0,59
Serum	Verdünnung	3,125 %	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
3000 G	♂ gesamt	55,02	58,61	63,48	77,13	31,71	15,79
	♀ gesamt	57,80	70,95	79,91	89,22	52,21	13,49
	p=	0,89	0,61	0,53	0,69	0,28	0,72

Tab. 13 Wachstumsraten (%) bezogen auf die Positivkontrolle (Wachstumsmedium) bei Inkubation der Zellen mit Seren von männlichen und weiblichen Spendern ohne signifikante Unterschiede in der Dosis-Wirkungsbeziehung bei Verdünnung mit **BSS**.

Zellen inkubiert mit Serum (3000 G), (Diluens NaCl)**,** lieferten die höchsten Wachstumsraten. Mit geringeren Wachstumsraten folgten absteigend Serum (500 G), Plasma (3000 G) und Plasma (500 G). Plasma (500 G) förderte bei allen Verdünnungen das Wachstum der Zellen am geringsten (Abb.10).



Serum 3000 G signifikant > Serum 500 G ($p= 6{,}51 \times 10^{-4}$)
Serum 3000 G signifikant > Plasma 3000 G ($p= 9{,}97 \times 10^{-7}$)
Serum 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 7{,}16 \times 10^{-7}$)

Abb.10 Zelluläre Proliferation nach 24-stündiger Inkubation mit Serum bzw. Plasma (500 G) und Serum bzw. Plasma (3000 G), verdünnt mit **NaCl**. Mittelwert von fünf Proben unter Mitführung von negativer (Benzalkoniumchlorid = 0 % Wachstum) und positiver Kontrolle (Wachstumsmedium = 100 % Wachstum).

Serum (3000 G) wies bei allen Verdünnungen die höchsten Wachstumsraten auf. Am stärksten wachstumsfördernd war die Verdünnung mit Minimalmedium. Bei der Verdünnung mit **BSS** und **NaCl** waren die Wachstumsraten konzentrationsabhängig; eine niedrige Konzentration des Blutproduktes war mit der Verdünnung **BSS** vorteilhaft, bei höherer Konzentration ergab die Inkubation mit **NaCl** höhere Wachstumsraten (Abb. 11).

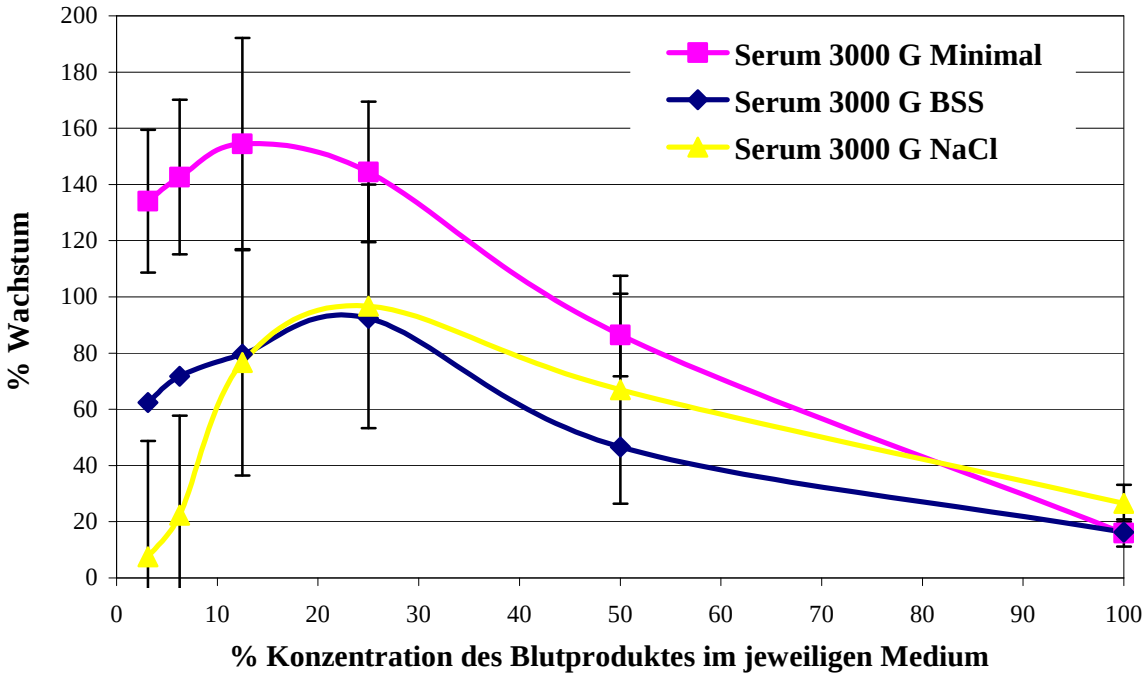
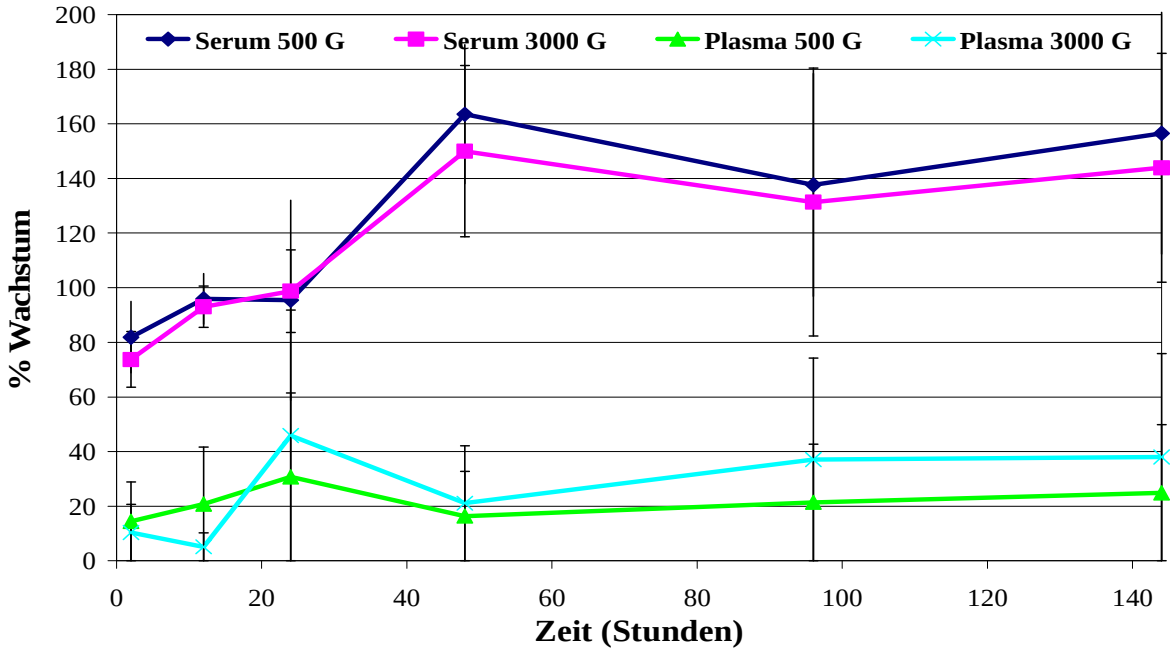


Abb. 11 Vergleich der Wachstumsraten von Serum (3000 G) in den Medien **NaCl**, **BSS** und **Minimalmedium**.

Zusammenfassend ist Serum (3000 G) das stärkste und Plasma (500 G) das proliferationsschwächste Produkt. Unabhängig vom verwendeten Diluens ist eine Konzentration der Proben von 12,5 – 25 % am stärksten proliferationsfördernd.

3.3.2.2 Zeit-Wirkungsbeziehung

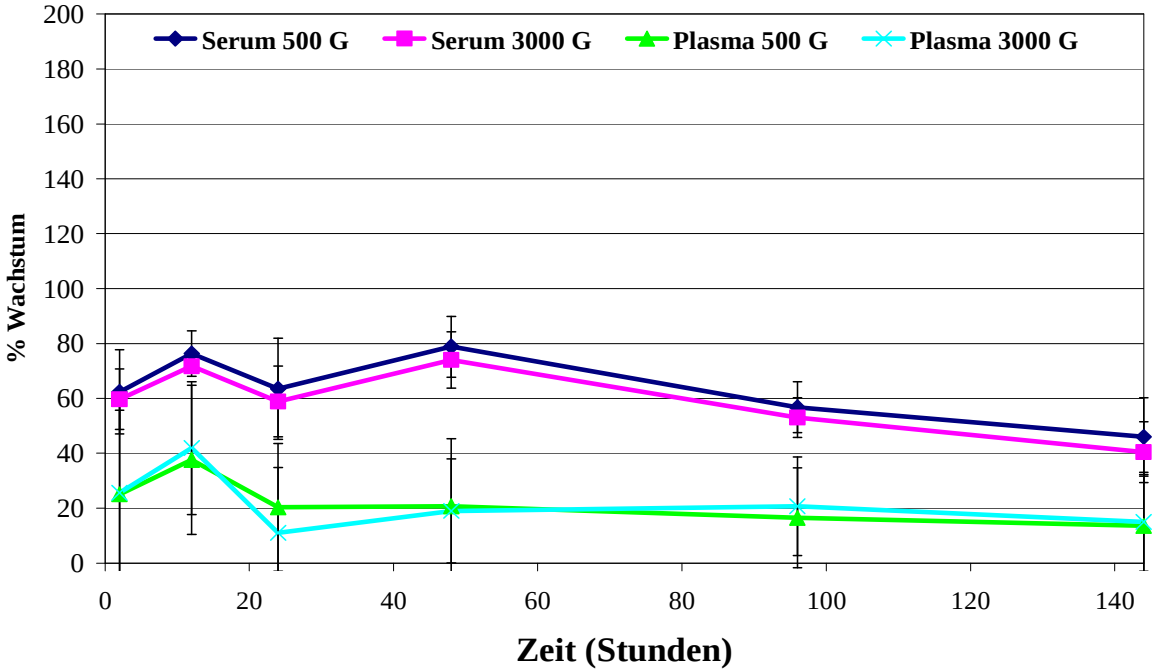
Bei der Verdünnung der Zellen mit **Minimalmedium** konnte in den ersten 48 Stunden eine deutliche Proliferationstendenz der Zellen beobachtet werden. Die verbleibenden 90 Stunden blieb das Wachstum der Zellen in etwa auf dem gleichen Niveau. Über den Zeitraum von 144 Stunden ergab die Inkubation mit Plasma (500 G) die niedrigsten Wachstumsraten (Abb. 12).



Serum 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1 \times 10^{-8}$)
Serum 500 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 3{,}97 \times 10^{-12}$)
Plasma 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1{,}98 \times 10^{-13}$)

Abb. 12 Zelluläre Proliferation bei Inkubation über 144 Stunden mit Serum bzw. Plasma (500 G) und Serum bzw. Plasma (3000 G), verdünnt auf 20 % mit **Minimalmedium**. Mittelwert von 5 Proben unter Mitführung von negativer (Benzalkoniumchlorid) und positiver Kontrolle (Wachstumsmedium).

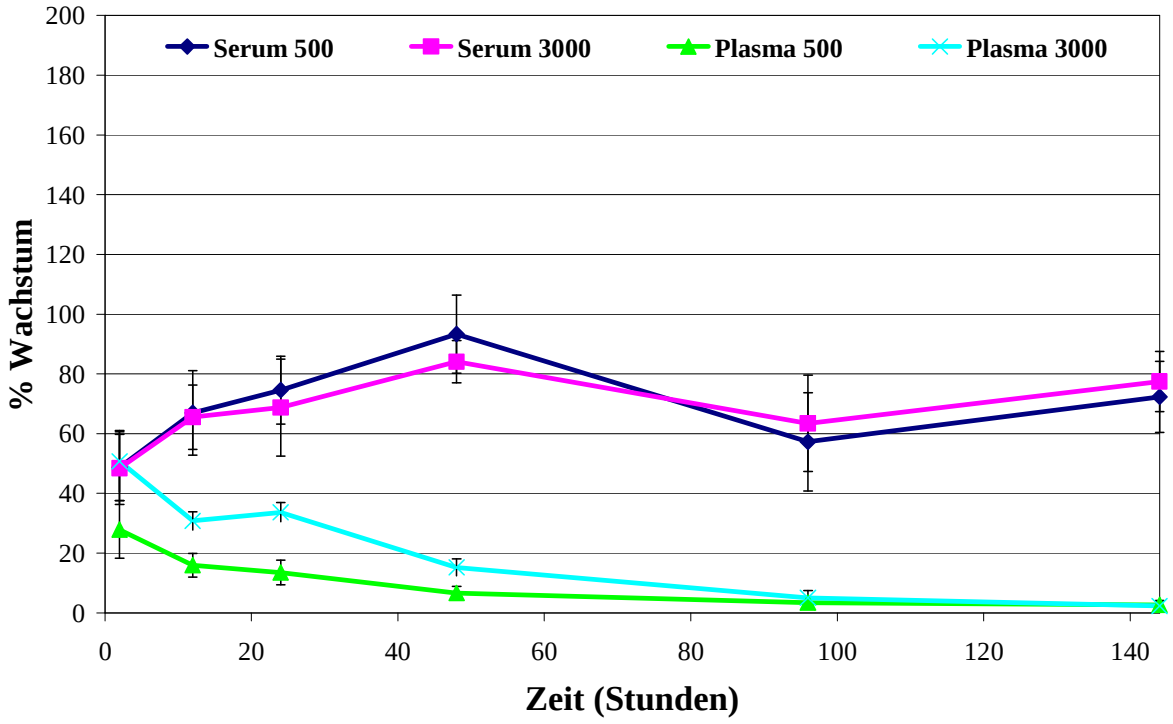
Bei der Verdünnung der Proben mit **BSS** liegt das Proliferationsniveau der Zellen insgesamt deutlich unter dem Niveau der mit **Minimalmedium** inkubierten Zellen. Mit Serumpräparaten inkubierte Zellen zeigten signifikant höhere Wachstumsraten als mit Plasmapräparaten inkubierte Zellen (Abb. 13).



Serum 3000 G signifikant > Serum 500 G ($p= 2,7 \times 10^{-5}$)
Serum 500 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 5,93 \times 10^{-12}$)
Serum 3000 G signifikant > Plasma 3000 G ($p= 3,39 \times 10^{-10}$)
Serum signifikant > Plasma ($p= 1,1 \times 10^{-20}$)

Abb. 13 Zelluläre Proliferation bei Inkubation über 144 Stunden mit Serum bzw. Plasma (500 G) und Serum bzw. Plasma (3000 G), verdünnt auf 20 % mit **BSS**. Mittelwert von 5 Proben unter Mitführung von negativer (Benzalkoniumchlorid) und positiver Kontrolle (Wachstumsmedium).

Bei Verdünnung der Proben mit **NaCl** waren mit Serumpräparaten inkubierte Zellen wachstumsstärker als mit Plasmapräparaten inkubierte Zellen. Dieser deutliche Wachstumsunterschied hatte sich schon bei Verdünnung der Proben mit BSS und Minimalmedium gezeigt (Abb. 14). Serumpräparate waren signifikant wachstumsfördernder als Plasmapräparate. Serumprodukte unterschieden sich nicht signifikant voneinander, Plasma (3000 G) war wachstumsfördernder als Plasma (500 G).



Serum 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1{,}11 \times 10^{-9}$)
Serum 3000 G signifikant > Plasma 3000 G ($p= 2{,}44 \times 10^{-7}$)
Plasma 3000 G signifikant > Plasma 500 G ($p= 1{,}78 \times 10^{-5}$)
Serum signifikant > Plasma ($p= 6{,}72 \times 10^{-18}$)

Abb. 14 Zelluläre Proliferation bei Inkubation über 144 Stunden mit Serum bzw. Plasma (500 G) und Serum bzw. Plasma (3000 G), verdünnt auf 20 % mit **NaCl**. Mittelwert von 5 Proben unter Mitführung von negativer (Benzalkoniumchlorid) und positiver Kontrolle (Wachstumsmedium).

Resultierend aus dem Zeit-Wirkungsversuch ergeben sich folgenden Aussagen:

Die Verdünnung der Proben mit Minimalmedium war am stärksten proliferationsfördernd. Bei optimaler Konzentration der Proben (12,5 - 25 %) hatten mit Serumpräparaten inkubierte Zellen stärkere Wachstumsraten als solche, die mit Plasmapräparaten inkubiert wurden. Nach der Inkubation der Zellen über zirka 50 Stunden zeigten diese die höchsten Wachstumsraten (Tab. 14).

Es fand sich kein signifikanter Proliferationsunterschied zwischen den Zellen, die mit den Diluentien NaCl oder BSS inkubiert wurden.

Dosis-Wirkungs-Versuch	Plasma (500 G)	Plasma (3000 G)	Serum (500 G)	Serum (3000 G)
Verdünnung mit Minimalmedium	102,28	136	136,76	154,4
Verdünnung mit BSS	44,47	50,08	83,63	92,4
Verdünnung mit NaCl	22,88	35,68	58,79	96,64
Mittelwert	**56,54**	**73,92**	**93,06**	**114,48**
Zeit-Wirkungs-Versuch				
Verdünnung mit Minimalmedium	113,3	160,3	163,5	150
Verdünnung mit BSS	25,1	41,9	78,8	74,1
Verdünnung mit NaCl	27,9	50,8	93,3	84,1
Mittelwert	**55,43**	**84,33**	**111,87**	**102,73**

Tab. 14 Maximales Wachstum (%) der Kornealzellen bei Inkubation mit Plasma- und Serumprodukten und Verdünnung mit **Minimalmedium**, **NaCl** und **BSS**.

3.3.2.3 Korrelation der Proteinkonzentration mit dem ATP-Gehalt der Zellen

Zwischen der Konzentration von Gesamtprotein, EGF, PDGF-AB, TGF-β_2, Fibronektin, Vitamin A, Vitamin E und dem jeweiligen ATP-Gehalt der Zellen als Marker der Proliferation konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden.

3.3.3 Migration

Die Diluentien der Blutprodukte im Kolonie-Dispersions-Versuch waren auch hier **Minimalmedium**, **BSS** und **NaCl**. Der Versuch wurde mit Proben von zwei Probanden durchgeführt. Die Migration der Zellen wurde durch Serumproben besser unterstützt. Nach Inkubation mit Plasmaproben lösten sich die Zellen bei der Fixierung mit 70%igem Methanol vor der Färbung mit Hämalaun nach Mayer komplett vom Gefäßboden ab, eine Auswertung war daher nicht möglich.

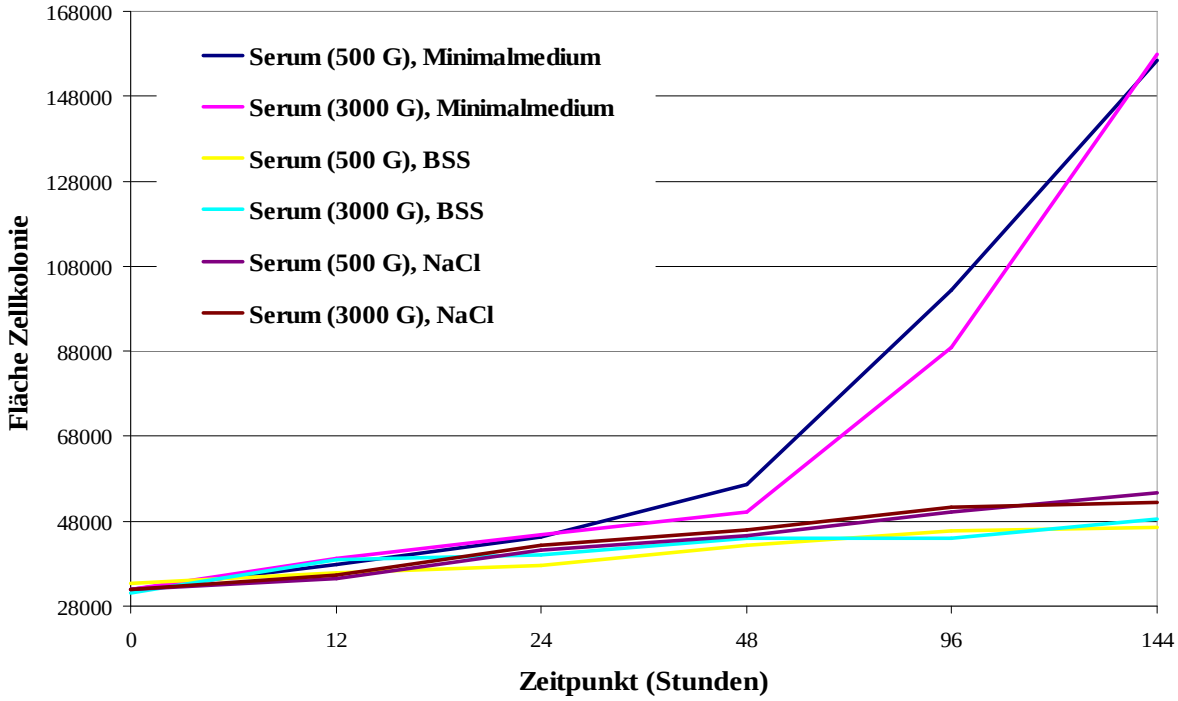


Abb. 15 Kolonie-Dispersions-Versuch über 144 Stunden mit Serum (500 G) und Serum (3000 G), verdünnt auf 25 % mit **Minimalmedium**, **NaCl** und **BSS.**

In Abb. 15 wird deutlich, dass das zur Verdünnung der Proben verwandte Diluens die entscheidende Rolle auf das Migrationsverhalten der Zellen nimmt. Bei den Proben, die mit **Minimalmedium** verdünnt wurden, kam es zu einer Flächenzunahme von 400 % im Gegensatz zu den Proben, die mit anderen Diluentien versetzt wurden und nur eine Flächenzunahme von zirka 50 % erreichten. Serum, welches mit 500 und 3000 G zentrifugiert und mit Minimalmedium verdünnt wurde, unterschied sich nicht signifikant (p= 0,93). Beide mit Minimalmedien verdünnten Seren erzielten in 144 Stunden eine signifikant größere Koloniefläche als bei Verdünnung mit NaCl ($p= 1,7 \times 10^{-4}$) und BSS ($p= 8,15 \times 10^{-5}$).

3.3.4 Differenzierung

3.3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopisch zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation mit 100%iger Testlösung bei Serum die Ausbildung eines konfluenten, flächig ausgedehnten Monolayers

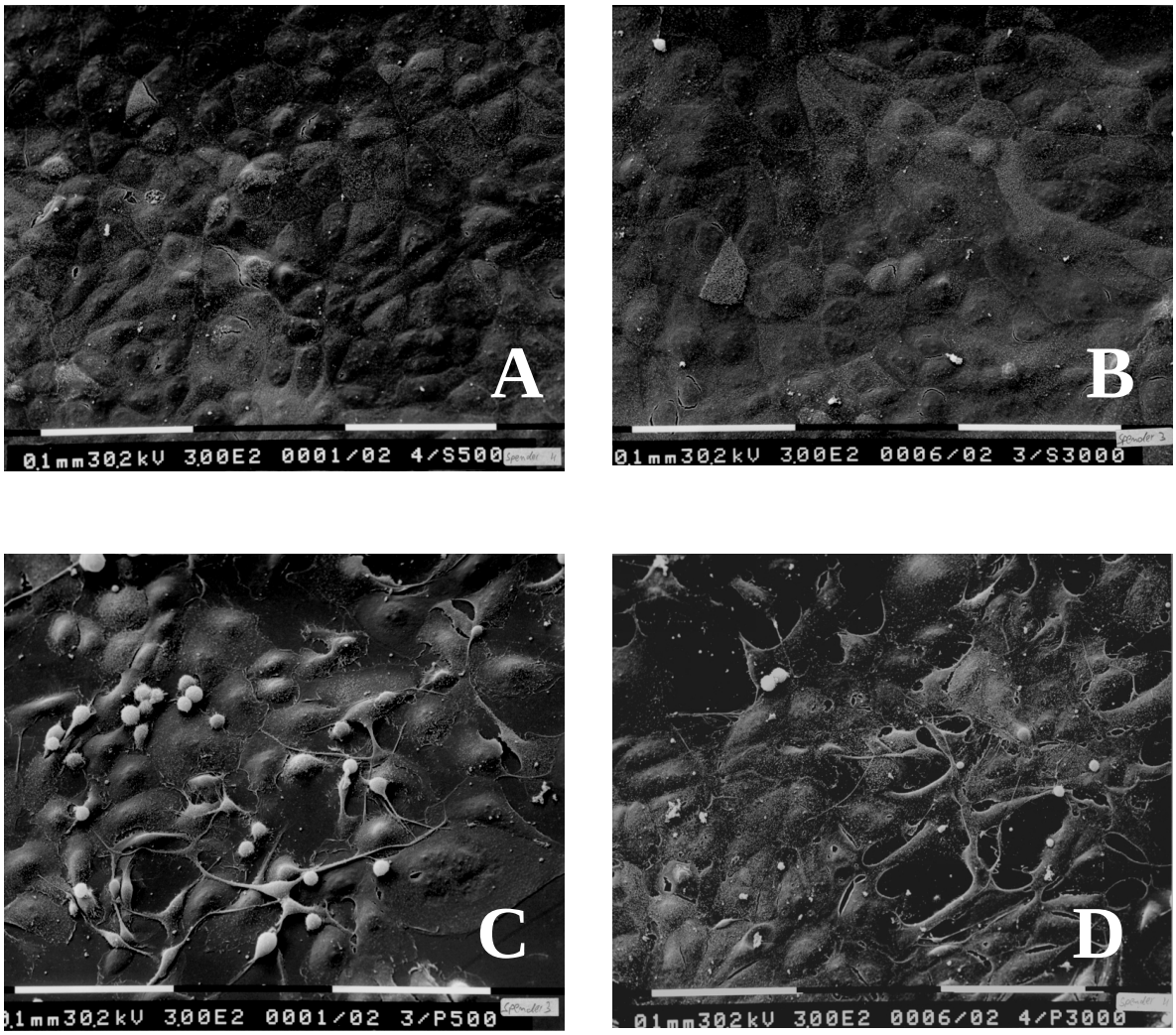


Abb. 16 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen humaner kornealer Epithelzellen nach Inkubation mit 100 % Testsubstanz. Bei Serumpräparaten (zentrifugiert mit A= 500 G, B= 3000 G) konfluente Zellrasen mit Ausbildung zahlreicher Mikrovilli. Plasmapräparate (zentrifugiert mit C= 500 G und D= 3000 G) zeigen Zeichen der Apoptose und einen lückenhaften Zellrasen (ein Balken entspricht 0,1 mm).

mit dichten Zellkontakten und frühzeitig auftretenden, zahlreichen Mikrovilli. Unterschiede ergaben sich im Hinblick auf den Ausdifferenzierungsgrad zu Gunsten der schneller zentrifugierten Präparate und somit denen, die weniger Thrombozyten enthielten. Die Inkubation mit Plasma führte zu einer geringeren Zelldifferenzierung; der Zellrasen wies Lücken auf, die Zellformen erschienen inhomogen, der Mikrovillibesatz war deutlich reduziert. Häufig lösten sich Zellen aus dem Gewebeverband, verloren ihren epithelialen

Phänotypen, kugelten sich ab und verloren an Größe (Pyknose). Diese morphologischen Befunde wurden als Zeichen einer apoptotischen Degeneration gewertet (Abb. 16 und 17). Rasterelektronenmikroskopisch zeigte plättchenarmes Serum somit die beste Entwicklung der Zellen im Hinblick auf ihre Ausdifferenzierung.

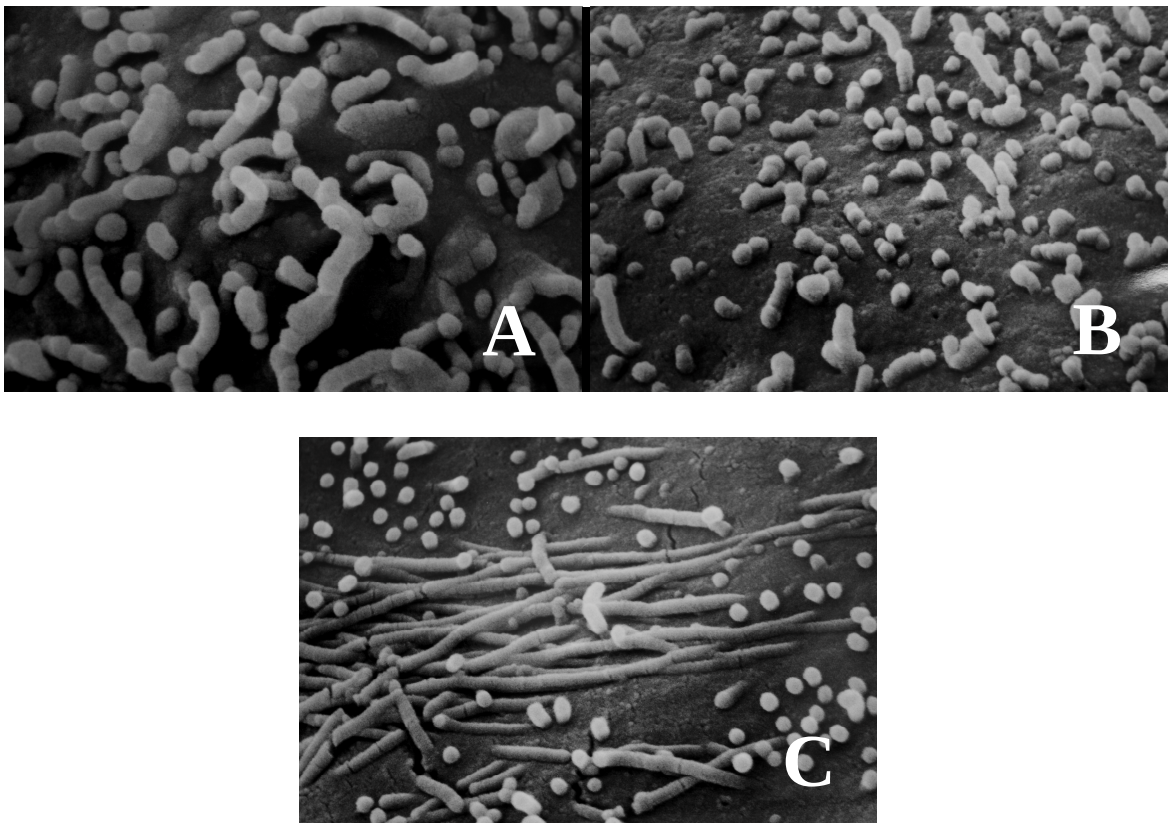


Abb. 17 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (1000-fach stärker vergrößerte Bilder als in Abb. 16) humaner kornealer Epithelzellen. Bild A zeigt eine deutliche Ausbildung von Mikrovilli (Inkubation mit Wachstumsmedium), Bild B verdeutlicht die schwächere Mikrovilliausbildung (Inkubation mit Plasma 500 G) und Bild C zeigt gut ausgeprägte Mikrovilli mit Längenwachstum (Inkubation mit Serum 500 G).

3.3.4.2 Immunhistochmie

Wie oben erwähnt wird Zytokeratin-3 von differenzierten, nicht aber von undifferenzierten Zellen des Hornhautepithels exprimiert. Daher war die Verwendung dieses Markers für die Beurteilung, ob eine Zelle Differenzierungsmerkmale aufwies oder nicht prädestiniert.

Bei makroskopischer Betrachtung fixierter 96-Loch-Platten zeigte sich eine unterschiedliche Färbung der einzelnen Lochplattenvertiefungen. Mit **Minimalmedium** inkubierte Zellen erschienen insgesamt intensiver gefärbt als solche, die mit **BSS** oder **NaCl** inkubiert wurden. Serumpräparate, verdünnt mit **Minimalmedium** oder **NaCl** waren intensiver gefärbt als Plasmapräparate. Serumhaltige und mit **Minimalmedium** verdünnte Präparate führten demnach zu einer besseren Ausdifferenzierung der Zellen als die übrigen Diluentien oder plasmahaltigen Produkte. Innerhalb der Gruppen Serum und Plasma konnte kein Unterschied zwischen Präparaten, die bei 500 G bzw. 3000 G zentrifugiert wurden, gefunden werden (Abb. 18). Die negative Kontrolle (PBS) zeigte wie erwartet keine, Differenzierungsmedium als positive Kontrolle ausdifferenzierte Zellen.

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung auf Zytokeratin-3-positive Zellen durch mikroskopische Zellzählung führte zu nicht objektivierbaren Ergebnissen. Dies lag zum einen an der subjektiven Einschätzung, welche Zellen noch als gefärbt bewertet wurden. Das größere Problem war aber die inhomogene Verteilung der Zellen in der Lochplattenvertiefung, die zu einer großen Schwankungsbreite der Ergebnisse, abhängig von der zufälligen Auswahl des zur Zellzählung eingestellten Mikroskopausschnittes bedingt war. Wegen dieser methodischen Probleme wurde dieser methodische Ansatz nach Vorversuchen nicht weiter verfolgt.

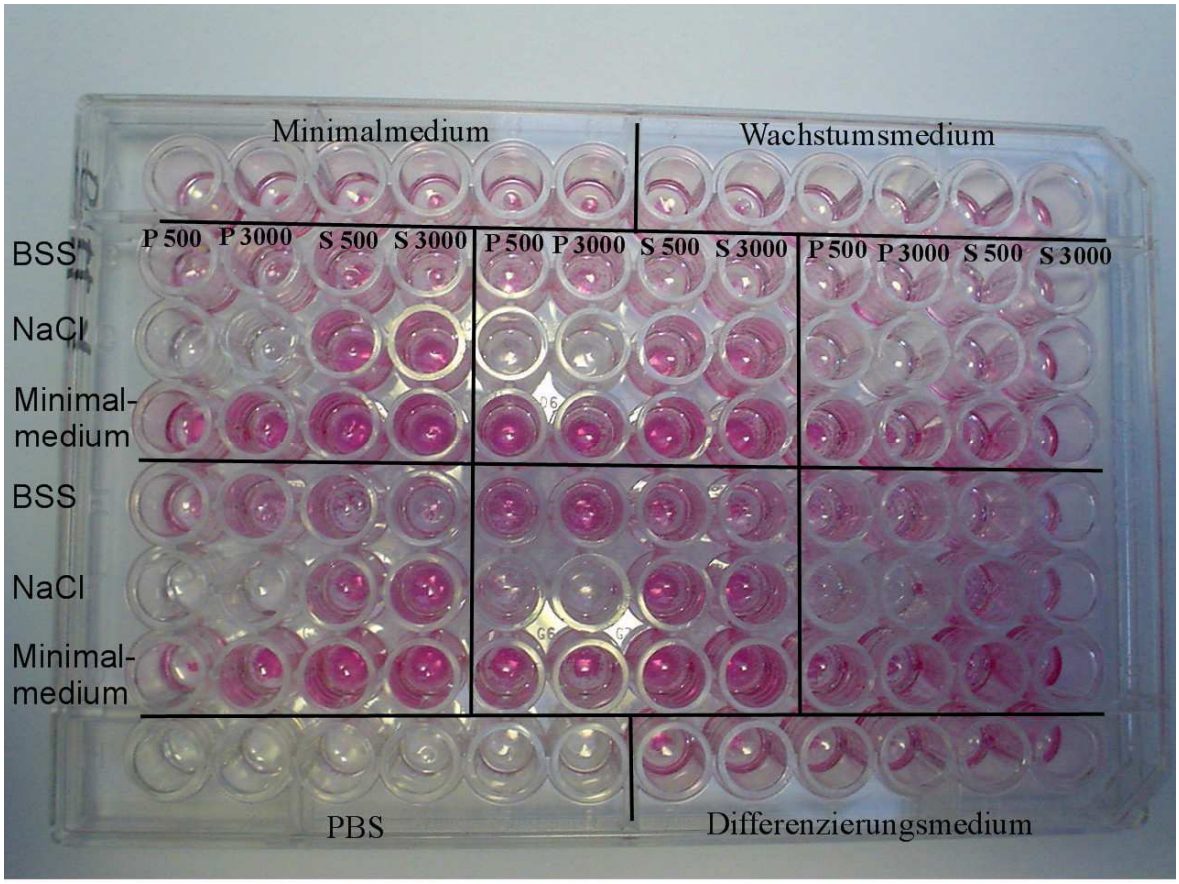


Abb. 18 Differenzierungsversuch auf einer 96-Lochplatte mit zytokeratin-3-positiven Zellen von sechs Probanden.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte in einem in vitro Zellkulturmodell die epitheliotrophe Wirksamkeit unterschiedlicher Blutprodukte, um Empfehlungen für die optimierte Herstellung von Präparaten zur topischen Behandlung von Defekten der Augenoberfläche zu geben.

Es konnte gezeigt werden, dass Plasma- und Serumpräparate sich stark in ihrer wundheilungsfördernden Wirkung unterscheiden. Serumpräparate waren Plasmapräparaten in Dosis-Wirkungs-, Zeit-Wirkungs-, Migrations- und Differenzierungsversuchen klar überlegen. Bei der Serumherstellung kommt es zur Gerinnung und Aktivierung der vorhandenen Thrombozyten und damit zur Abgabe von Wachstumsfaktoren in das Serum. Die für die Wundheilung entscheidenden Faktoren sind in den α-Granula der Thrombozyten enthalten. Durch Degranulation werden in der Initialphase der Wundheilung diese Wachstumsfaktoren freigesetzt. Sie locken durch chemotaktische und chemokinetische Wirkung Entzündungszellen (Makrophagen, Neutrophile und Lymphozyten) in die Wunde und durch mitogene Wirkung kommt es zur Proliferation von Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen und Keratinozyten. Die Verwendung von Serumpräparaten war deutlich wachstumsförderlicher als die von Plasma, was sich auch in den rasterelektronischen Aufnahmen widerspiegelte.

Aber nicht nur der Art des Blutproduktes kommt eine große Bedeutung zu, sondern auch die Herstellungsparameter haben einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit. Mit 3000 G zentrifugiertes Serum war proliferationsfördernder als mit 500 G zentrifugiertes Serum. Das gleiche Ergebnis wurde bei Plasmaprodukten gefunden. Demnach führt die schärfere Zentrifugation sowohl bei Serum- als auch bei Plasmapräparaten zu einer erhöhten epitheliotrophen Kapazität. Schonender zentrifugiertes Plasma enthielt signifikant mehr Thrombozyten als Serum; die nach der Zentrifugation verbleibenden Thrombozytenreste in Plasmapräparaten könnten eine schädliche Wirkung auf das Wachstum der Kornealzellen haben. Andere Autoren haben bereits vermutet, dass die thrombozytären Membranreste, wie sie insbesondere in plättchenreichem Plasma vorliegen, eine vermehrte Apoptose induzieren [9]. Plasma (500G) war das Blutprodukt mit den schwächsten Wachstumsraten inkubierter Kornealzellen, was diese Annahme stützt. Ein Einfluss, der von in Plasma befindlichen Erythrozyten ausgeht ist

unwahrscheinlich, da diese durch die Zentrifugation weitestgehend entfernt wurden. Die Verwendung von Plasma zeigte in allen Versuchen dieser Arbeit, gegenüber Serumprodukten, eine nur schwache wachstumsfördernde Wirkung auf inkubierte Hornhautepithelzellen. Die Empfehlung zur Verwendung von Plasmaprodukten für die Produktion von Serum-Augentropfen kann daher an dieser Stelle nicht ausgesprochen werden.

Ebenfalls kommt der Wahl des Diluens eine entscheidende Bedeutung zu. Die Inkubation mit Minimalmedium führt zu einer deutlicheren Proliferationsförderung der Kornealzellen als die Verdünnung mit NaCl oder BSS. Die stark wachstums- und migrationsfördernde Wirkung von Minimalmedium verwundert nicht, da es Zusätze wie Insulin, EGF und FGF enthält. Minimalmedium eignet sich theoretisch am besten, um nach Zugabe von Serum die Proliferation und Migration einer Zellkultur zu unterstützen. Da es jedoch für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen ist, sollte entsprechend der Ergebnisse zur Verdünnung von Serum am besten BSS oder 0,9 % NaCl verwendet werden. Beim Vergleich von **NaCl** und **BSS** zeigte sich, dass die Verwendung von NaCl als Diluens von Serumpräparaten das Wachstum der Zellen nicht signifikant besser unterstützte als BSS. BSS besitzt eine bessere Pufferkapazität als NaCl und wird daher auch in der klinischen Routine z. B. als intraokuläre Spüllösung verwendet [64].

Um Erklärungsansätze für den Einfluss der Herstellungsparameter auf die epitheliotrophe Kapazität zu erhalten, wurden mögliche relevante Inhaltsstoffe der verschiedenen Blutpräparate gemessen. Im Folgenden werden die Unterschiede der Präparatzusammensetzungen und deren möglicher Einfluss auf die Versuchsergebnisse diskutiert.

Epitheliotrophe Faktoren, wie EGF, Substanz P, Vitamin A und Fibronektin tragen zur Erhaltung oder zur Wundheilungsreaktion von Horn- und Bindehautepithelien bei [25]. Fehlen diese Proteine, z. B. im Rahmen eines schweren Tränenmangels, ist die Regenerationsfähigkeit der Augenoberfläche kompromittiert. Es können Oberflächendefekte entstehen und bis zum sterilen Hornhautulkus fortschreiten. Pharmazeutische Produkte können bis heute die epitheliotrophe Funktion der Tränen nicht substituieren. Fibronektin, EGF und FGF wurden daher klinisch zur Therapie von Epitheldefekten getestet, aber da die Effektivität der einzelnen Wirkstoffe und ihre Stabilität zu gering waren, haben sie sich bis heute nicht in den therapeutischen

Standardkonzepten etablieren können [16, 37]. Aufgrund der vermuteten epitheliotrophen Bedeutung von Wachstumsfaktoren in Blutpräparaten, erfolgte die Messung des Gehaltes von Gesamtprotein, EGF, PDGF, TGF-β_2, Fibronektin, Vitamin A und E.

In keinem anderen Präparat war **TGF-β_2** in so hoher Konzentration vorhanden wie in Plasma (500 G), daher stützen meine Ergebnisse den schon in der Literatur genannten Mechanismus, dass TGF-β_2 konzentrationsabhängig die Bildung von Kolonien in Zellkulturen von peripherem Hornhautepithel inhibiert. Kruse et al. fanden ähnliche Ergebnisse, die eine dosisabhängige Inhibition durch TGF-β_2 nachweisen konnten [35]. Allerdings ist die Wirkung von TGF-β sehr differenziert zu betrachten, da sie konzentrationsabhängig hemmend und fördernd sein kann. TGF-β ist in der Lage die intrazelluläre Synthese von TGF-β selbst zu stimulieren, sodass bereits geringe Werte im Serum die Gesamtkonzentration und den Differenzierungsgrad ändern können. So zeigte die Inkubation der Zellen mit Plasma (3000 G) bei den Verdünnungen mit BSS und NaCl keine überzeugenden Ergebnisse, die auf eine konzentrationsabhängige proliferationsfördernde Wirkung von TGF-β_2 schließen lassen, obwohl sich in diesem Präparat am wenigsten TGF-β_2 befand. Dieses Präparat lieferte nur bei der Verdünnung mit Minimalmedium bessere Ergebnisse, sodass am ehesten von einem positiven Effekt durch das Diluens auszugehen ist.

EGF war in Serumpräparaten, welche wachstumsfördernder waren als Plasmapräparate, in höherer Konzentration vorhanden als in Plasmapräparaten. Andere Autoren verweisen ebenfalls auf die Förderung von Proliferation und Differenzierung durch EGF [7, 32, 54, 56]. Das Protein konnte in Plasma (3000 G) nur in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Diese war um zwei Zehnerpotenzen niedriger als in allen anderen Präparaten. Dennoch führte die Inkubation der Zellen mit Plasma (3000 G) in Dosis-Wirkungs- und Zeit-Wirkungsversuchen nicht zu den geringsten Proliferationsraten, daher ist die Anwesenheit von EGF in Zellkulturen isoliert betrachtet kein Proliferationsgarant.

PDGF wird sowohl in kornealen Epithelzellen, als auch in Keratozyten und Endothelzellen exprimiert, unterstützt die Proliferation und induziert die Migration dieser Zellen [23, 30]. In den Untersuchungen war im Präparat mit der deutlichsten Proliferationsförderung (Serum 3000 G) die höchste PDGF-Konzentration vorzufinden. Auch Imanishi und andere Autoren hielten fest, dass PDGF eine starke proliferationsfördernde Wirkung hat [26, 28], was die Untersuchungsergebnisse bestätigen. Allerdings bleibt festzuhalten, dass die Inkubation der Zellen mit Plasma (3000 G) zumeist bessere Ergebnisse hervorbrachte als

Plasma (500 G) und dennoch mit Abstand die niedrigste PDGF-Konzentration besaß. Eine reine Proliferationsförderung durch PDGF wird damit ggf. relativiert.

Die Förderung der Zelldifferenzierung der Augenoberflächenepithelien durch Vitamin A ist bekannt und wird teilweise durch Reduktion der EGF-Rezeptoren in Bindehautepithelzellen vermittelt. Die Konzentrationen von **Vitamin A** und **E** waren signifikant höher in Serum- als in Plasmapräparaten. Hinsichtlich der Zellproliferation erzielten die Serumpräparate auch bessere Ergebnisse als die Plasmapräparate. Die Untersuchungen stützen die These des positiven Einflusses von Vitamin A auf die epitheliotrophe Kapazität, da Retinol in Serumpräparaten in erhöhter Konzentration vorkommt. Vitamin A scheint eine modulierende Rolle in der Proliferation von Kornealzellen zu spielen, die sowohl inhibierend als auch proliferationsfördernd sein kann [33, 34].

Die Konzentration der Proteine EGF, PDGF, Vitamin A und E in den untersuchten Proben scheint von der Koagulation abzuhängen. Es findet sich in Serumpräparaten ein deutlich höherer Anteil dieser Proteine, die fast alle proliferations-, differenzierungs- und migrationsfördernd sind [32, 38, 44, 56]. Der Grund für den starken Einfluss der Koagulation auf die Proteinkonzentration in den Produkten könnte beispielsweise für EGF und PDGF in deren Speicherung in Thrombozyten und Freisetzung aus diesen bei der Koagulation liegen [24].

Bei **Fibronektin**, einem disulfidhaltigen Glykoprotein, liegen die Konzentrationen in den jeweiligen Präparaten im Mittel nah beieinander, sind aber in Serumpräparaten in höherer (nicht signifikanten) Konzentration vorzufinden. Im Migrationsversuch, bei dem Fibronektin die wichtigste Rolle als migrationsförderndes Protein spielen soll, konnte wegen fehlender Zelladhäsion am Gefäßboden von mit Plasma inkubierten Zellen kein Vergleich der Ergebnisse von mit Serum inkubierten Zellen erfolgen, da es bei der Fixierung plasmainkubierter Zellen zur Ablösung vom Gefäßboden kam [43]. Serum scheint die Zelladhäsion günstig zu beeinflussen, was möglicherweise zu der etwas höheren Fibronektinkonzentration, welche die Zelladhäsion stimuliert, in Serumpräparaten passen würde [40]. Der letztendliche Grund für die frühe Ablösung der Zellen vom Gefäßboden bei Verwendung von Plasmapräparaten bei der Fixierung bleibt unklar. Der Grund für die schlechtere Zelladhäsion muss in der Zusammensetzung plasmahaltiger Produkte liegen. Möglich sind toxische Einflüsse oder der verminderte Gehalt an zelladhäsionsstimulierenden (z. B. Fibronektin, Tokopherol) Proteinen.

Bei der Inkubation der Kornealzellen mit Serumpräparaten war vor allem die Wahl des Diluens entscheidend. Ein signifikanter Unterschied in der Migration zwischen den mit Serum (500 G) und Serum (3000 G) inkubierten Zellen bestand nicht; zudem bestand kein signifikanter Unterschied in der Fibronektinkonzentration zwischen 500 G und 3000 G-Präparaten, sodass die Frage gestellt werden muss, ob Fibronektin ein ausschlaggebender Faktor für die Migration der Zellen darstellt oder ob vielmehr die Wahl des Diluens die Migrationsfähigkeit der Zellen bestimmt.

Die **Gesamtproteinkonzentration** der Proben war in plättchenarmen Präparaten höher als in plättchenreichen, was als Zeichen der erhöhten Traumatisierung von zellulären Blutbestandteilen bei schärferer Zentrifugation gewertet werden könnte. Plasma enthielt unter den plättchenarmen Präparaten eine höhere Proteinkonzentration als Serum. Dies könnte der Grund für die schlechtere epitheliotrophe Kapazität von Plasmaprodukten sein. Da die Proteinkonzentration in plättchenarmen Plasmapräparaten höher ist, könnten vermehrt inhibierende Proteine oder toxisch wirkende Substanzen in diesen Produkten enthalten sein, die zu einer verminderten epitheliotrophen Kapazität führen. Welche Proteine dies sein könnten, bleibt vorerst ungeklärt.

Letztendlich kann keine sichere Aussage darüber gemacht werden, ob die unterschiedliche epitheliotrophe Kapazität hauptsächlich in den verschiedenen Konzentrationen der in dieser Arbeit gemessenen Wachstumsfaktoren begründet ist, zum anderen ist zu diskutieren, ob es einen Schwellenwert für die gemessenen Proteine gibt, die erst ab einer bestimmten Konzentration zu einer Erhöhung der epitheliotrophen Kapazität führen, wie zum Beispiel bei TGF-β_2. Denkbar ist auch die Wirkung (inhibierend oder proliferationsfördernd) nicht gemessener Faktoren, welche die übrigen in dieser Arbeit gemessenen Bestandteile in ihrer Wirkung übertreffen. Darüber hinaus wäre eine komplexe Wechselwirkung der Wachstumsfaktoren untereinander denkbar, die mit den bisher durchgeführten Versuchen nicht erklärt werden kann.

In Bezug auf eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Geschlechtsunterschied zeigten sich insgesamt wenige Hinweise. Bei der Analyse der Proteinkonzentrationen konnte für Vitamin A in Serumpräparaten ein deutlich höherer Gehalt bei Männern festgestellt werden, der aber nicht zu einer signifikanten Korrelation zwischen Retinol und Zellwachstum führte. Auch andere Autoren bestätigen den erhöhten Wert an Retinol bei männlichen Probanden [12].

In Serum von Männern konnten signifikant höhere Werte von Fibronektin als bei Frauen gemessen werden. Die Fibronektinkonzentrationen waren hier mehr als doppelt so hoch als bei Frauen. Nelson berichtet in seiner Arbeit über positive Effekte topisch verabreichten Fibronektins, welches u. a. die Zellmigration und die Adhäsion an Kunststoffen unterstützen soll [40, 65]. Die erhöhten Werte in Serumproben könnten ein Grund für das gute Migrationsverhalten von mit Serum inkubierten Zellen beim Migrationsversuch sein. Um eine Aussage über den Einfluss des Geschlechtes machen zu können, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, da in diesem Versuch nur Proben von zwei Probanden genutzt wurden und somit keine geschlechterspezifische Aussage zur Verfügung steht.

Für die Herstellung von Plasma wurde das Vollblut von Probanden zur Antikoagulation in mit Zitratpuffer angereicherte Einmalcontainer überführt. Um eine eventuelle Toxizität des als Antikoagulationsmittel eingesetzten Zitrates auszuschließen, wurde zunächst die Wirkung von Zitratpuffer auf das Zellwachstum geprüft. Mit steigender Zitratkonzentration konnte kein wachstumshemmender Effekt nachgewiesen werden. Das Zellwachstum ist aber bei Verdünnung mit NaCl, BSS und Minimalmedium in Abhängigkeit von der Zitratkonzentration unterschiedlich. Es müsste in weiteren Experimenten geklärt werden, welcher Effekt der Wachstumsförderung zugrunde liegt und wie groß ihr Einfluss auf das Ergebnis ist. Eine These wäre, dass Zitrat aufgrund seiner Pufferwirkung einen positiven Effekt auf die Proliferation von Kornealzellen ausübt.

Unverdünntes Serum zeigte in Dosis-Wirkungsversuchen stets schwache Wachstumsraten der inkubierten Hornhautepithelzellen, eine Verdünnung auf 12,5 - 25 % stellte sich als optimal heraus. Eine Begründung für die bessere epitheliotrophe Kapazität von verdünntem Serum könnte die konzentrationsabhängige Wirkung von Wachstumsfaktoren sein, wie sie z. B. bei TGF-β besteht [35]. Wie oben bereits genannt, kann TGF-β konzentrationsabhängig hemmend und fördernd sein. Die TGF-β-Konzentrationen der Serumpräparate waren niedriger als im Plasma (500 G), was als eventueller Hinweis für die teils besseren Resultate von Serumpräparaten gedeutet werden könnte. Bei einer Dosis von 25 % wurden die besten Ergebnisse im Dosis-Wirkungsversuch erzielt, was einer TGF-β_2-Konzentration <0,5 ng/ml entspricht, die Kruse et al. als proliferationsfördernd beschreibt [35].

Der Vorteil der Verwendung von verdünntem Serum wird bereits bei den klinischen Studien Tsubotas erwähnt, der eine 1:5 Verdünnung bei der Behandlung des trockenen

Auges beim Sjögren-Syndrom erfolgreich einsetzte [57]. Dennoch berichteten andere klinische Studien auch mit unverdünntem Serum über Heilungserfolge, so z. B. De Souza mit unverdünntem Serum bei der Therapie von persistierenden Epitheldefekten. Die mittlere Defektdauer konnte hier deutlich reduziert werden. Auch Poon und Geerling hatten mit unverdünntem Serum in der Wundheilung Erfolg [18, 48], allerdings sind diese klinischen Studien z. B. aufgrund der verschiedenen Patientenkollektive und zum Teil durch das Fehlen von Kontrollkollektiven nur schwer miteinander vergleichbar.

4.1 Empfehlungen für ein standardisiertes Produktionsverfahren zur Herstellung von Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche

Die Experimente legen nahe, dass Augentropfen aus Eigenblut zur Therapie bei Augenoberflächenerkrankungen nicht aus Plasma, sondern aus Serum hergestellt werden sollten. Qualitätskontrollierte Plasmaprodukte sind keine sinnvolle Alternative zu der deutlich arbeitsintensiveren Herstellung von autologem Serum.

Als Diluens würde sich Minimalmedium am besten eignen, da es aber für die klinische Anwendung keine zu verwendende Alternative ist, wird daher die Anwendung von NaCl empfohlen.

Eine hohe Zentrifugalgeschwindigkeit des Vollblutes bei der Serumherstellung hat positive Auswirkungen auf Proliferation, Migration und Differenzierung der Kornealzellen und führt zur sauberen Abtrennung von korpuskulären Bestandteilen. Andere Autoren haben bereits vermutet, dass zum Beispiel thrombozytäre Membranreste, wie sie insbesondere in plättchenreichem Plasma vorliegen, eine vermehrte Apoptose induzieren [9].

Auch wenn die Ergebnisse von in vitro Untersuchungen in der Regel nur eingeschränkt auf die klinische Situation zu übertragen sind, erscheint es vor dem Hintergrund der klinisch bereits als deutlich unterschiedlich beschriebenen Erfolge der Therapie mit Serum-Augentropfen sinnvoll, zunächst die Produktionsbedingungen für Blutpräparate zu standardisieren, bevor prospektive randomisierte klinische Studien den Stellenwert dieser Therapieform evaluieren können [19]. Diese Arbeit liefert hierfür eine Empfehlung.

5 Zusammenfassung

Augentropfen aus Blutpräparaten stellen eine Möglichkeit zur Behandlung von Augenoberflächenerkrankungen dar. Ihre Herstellung ist bislang nicht standardisiert, daher wurde der Einfluss der Zentrifugalkraft, Gerinnungszeit und des Diluens auf die epitheliotrophe Kapazität von Blutprodukten anhand eines Zellkulturmodells untersucht. Aus Vollblut von zehn Probanden wurden Serum- und Plasmaproben hergestellt und mit je 500 bzw. 3000 G zentrifugiert. Die in Plasma- und Serumproben enthaltenen Proteine EGF, PDGF, TGF-β_2, Fibronektin und Vitamin A und E und die Gesamtproteinkonzentration der Präparate wurden gemessen. In Dosis-Wirkungs- und Zeit-Wirkungs-Experimenten wurden Kulturen humaner immortalisierter Hornhautepithelzellen mit den Serum- und Plasmapräparaten, verdünnt mit serumfreiem Medium, BSS oder NaCl, inkubiert und der zelluläre ATP-Gehalt als Maß für die Zellproliferation bestimmt. Die Ausdifferenzierung der Zellkulturen wurde sowohl mittels Rasterelektronenmikroskopie als auch mit immunhistochemischer Untersuchung (Zytokeratin-3) untersucht, die Migration mittels Dispersions-Kolonie-Assay quantifiziert. Bei der Gesamtproteinbestimmung hatten mit 3000 G zentrifugierte Präparate einen höheren Proteinanteil als mit 500 G zentrifugierte Produkte. Plasma (3000 G) enthielt auffällig wenig EGF, PDGF-AB und TGF-β_2. Die Konzentrationen von EGF, Fibronektin, Retinol und Tokopherol waren in Serumprodukten signifikant höher als in Plasmaprodukten.

Die Zellproliferation wurde in abnehmender Reihenfolge am besten durch Inkubation mit 12,5-25%ig verdünntem Serum (3000 G), Serum (500 G), Plasma (3000 G) und Plasma (500 G) unterstützt. Auch Differenzierung und Migration wurden durch Serum- besser als durch Plasmapräparate gefördert. Die besten Ergebnisse wurden durch Verdünnung der Präparate mit Minimalmedium erzielt. Der biochemische Charakter von Serum-Augentropfen wird durch die Wahl der Parameter Gerinnung und Zentrifugalkraft beeinflusst. Die Verwendung einer hohen Zentrifugalkraft bei der Herstellung von Plasma bzw. Serum erhöht die epitheliotrophe Kapazität von Blutprodukten, möglicherweise durch Beseitigung von Thrombozytenresten. Plasma ist kein geeigneter Ersatz zu Serum-Augentropfen. Die Produktion von Serum-Augentropfen sollte im Hinblick auf die Dauer der Gerinnung und das zu verwendende Diluens weiter optimiert und standardisiert werden, bevor klinische Studien zu ihrer Effektivität durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Araki-Sasaki K , O.Y., Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, and H.H. Tano Y, *An SV-40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995(36): p. 614–621.
2. Barton, K., Nava, A., Monroy, D. C., Pflugfelder, S. C., *Cytokines and tear function in ocular surface disease.* Adv Exp Med Biol, 1998. 438: p. 461-469.
3. Chen, K.H., Hsu, W. M., Chiang, C. C., Li, Y. S., *Transforming growth factor-beta2 inhibition of corneal endothelial proliferation mediated by prostaglandin.* Curr Eye Res, 2003. 26(6): p. 363-370.
4. Collins, M.K., Perkins, G. R., Rodriguez-Tarduchy, G., Nieto, M. A., Lopez-Rivas, A., *Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis.* Bioessays, 1994. 16(2): p. 133-138.
5. Cree I. A., A.P.E., *Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines.* Toxicol In Vitro, 1997(11): p. 553-556.
6. Crouch, S.P., et al., *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity.* J Immunol Methods, 1993. 160(1): p. 81-88.
7. Daniele, S., et al., *The effect of the epidermal growth factor (EGF) on the corneal epithelium in humans.* Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 1979. 210(3): p. 159-165.
8. Daniels, J.T., Khaw, P. T., *Temporal stimulation of corneal fibroblast wound healing activity by differentiating epithelium in vitro.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. 41(12): p. 3754-3762.
9. Dugrillon A., L.S., Nguyen X. D., Klueter H., *Platelets applied to wounds and in tissue regeneration: induction of proliferation apoptosis by platelet membranes*. Infusion therapy and transfusion medicine, ed. S.W.e. Mempel W. 2002. p. 70–71.

10. Ebner S, Y.L., Völcker HE,Kruse FE, *Effekt von autologem Serum auf die Heilung nicht-infektiöser Hornhautulcera und Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren in der Kornea.* Ophthalmologe 98, 2001. Suppl 1: p. S27.

11. Elder, M.J., Hiscott, P., Dart, J. K., *Intermediate filament expression by normal and diseased human corneal epithelium.* Hum Pathol, 1997. 28(12): p. 1348-1354.

12. Faure, H., Preziosi, P., Roussel, A. M., Bertrais, S., Galan, P., Hercberg, S., Favier, A., *Factors influencing blood concentration of retinol, alpha-tocopherol, vitamin C, and beta-carotene in the French participants of the SU.VI.MAX trial.* Eur J Clin Nutr, 2006. 60(6): p. 706-717.

13. Ferreira de Souza, R., Kruse, F. E., Seitz, B., *Autologes Serum bei sonst therapieresistenten Hornhautepitheldefekten - Prospektive Studie an den ersten 70 Augen.* Klin Monatsbl Augenheilkd, 2001. 218(11): p. 720-726.

14. Fox, R.I., Chan, R., Michelson, J. B., Belmont, J. B., Michelson, P. E., *Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca.* Arthritis Rheum, 1984. 27(4): p. 459-461.

15. Fredj-Reygrobellet, D., Plouet, J., Delayre, T., Baudouin, C., Bourret, F., Lapalus, P., *Effects of aFGF and bFGF on wound healing in rabbit corneas*. Curr Eye Res. Vol. 6. 1987. p. 1205-1209.

16. Fukuda, M., Fullard, R. J., Willcox, M. D., Baleriola-Lucas, C., Bestawros, F., Sweeney, D., Holden, B. A., *Fibronectin in the tear film.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. 37(2): p. 459-467.

17. Garcia Jimenez V, V.V.B., Baabonde Arbaeiza B, Cahue Carpintero I, Celemin Vinuela M, Simo Martinez R, *The elaboration, use and evaluation of eye-drops with autologous serum in corneal lesions.* Farm Hosp, 2003. 27 (1): p. 21-25.

18. Geerling, G., Daniels, J. T., Dart, J. K., Cree, I. A., Khaw, P. T., *Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. 42(5): p. 948-956.

19. Geerling, G., Hartwig, D., *Autologe Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche. Eine Übersicht zur Wirksamkeit und Empfehlungen zur Anwendung.* Ophthalmologe, 2002. 99(12): p. 949-959.

20. Geerling, G., Honnicke, K., Schroder, C., Framme, C., Sieg, P., Lauer, I., Pagel, H., Kirschstein, M., Seyfarth, M., Marx, A. M., Laqua, H., *Quality of salivary tears following autologous submandibular gland transplantation for severe dry eye.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1999. 237(7): p. 546-553.

21. Gordon, J.F., P. Johnson, and D.C. Musch, *Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects of the corneal epithelium. Chiron Vision Fibronectin Study Group.* Am J Ophthalmol, 1995. 119(3): p. 281-287.

22. Goto, E., Shimmura, S., Shimazaki, J., Tsubota, K., *Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum.* Cornea, 2001. 20(8): p. 807-810.

23. Haber, M., Cao, Z., Panjwani, N., Bedenice, D., Li, W. W., Provost, P. J., *Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB and TGF-beta 1) on cultured equine epithelial cells and keratocytes: implications for wound healing.* Vet Ophthalmol, 2003. 6(3): p. 211-217.

24. Hartwig, D., et al., *Topical treatment of ocular surface defects: comparison of the epitheliotrophic capacity of fresh frozen plasma and serum on corneal epithelial cells in an in vitro cell culture model.* Transfus Med, 2005. 15(2): p. 107-113.

25. Herminghaus, P., Geerling, G., Hartwig, D., Wedel, T., Dibbelt, L., *Epitheliotrophe Kapazität von Serum- und Plasmaaugentropfen Einfluss der Zentrifugation.* Ophthalmologe, 2004. 101(10): p. 998-1005.

26. Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., Kinoshita, S., *Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea.* Prog Retin Eye Res, 2000. 19(1): p. 113-129.

27. Joh, T., et al., *Physiological concentrations of human epidermal growth factor in biological fluids: use of a sensitive enzyme immunoassay.* Clin Chim Acta, 1986. 158(1): p. 81-90.

28. Kamiyama, K., et al., *Effects of PDGF on the migration of rabbit corneal fibroblasts and epithelial cells.* Cornea, 1998. 17(3): p. 315-325.

29. Kao, W.W., Kao, C. W., Kaufman, A. H., Kombrinck, K. W., Converse, R. L., Good, W. V., Bugge, T. H., Degen, J. L., *Healing of corneal epithelial defects in plasminogen- and fibrinogen-deficient mice.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. 39(3): p. 502-508.

30. Kim, W.J., R.R. Mohan, and S.E. Wilson, *Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. 40(7): p. 1364-1372.

31. Kitazawa, T., Kinoshita, S., Fujita, K., Araki, K., Watanabe, H., Ohashi, Y., Manabe, R., *The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. 31(9): p. 1773-1778.

32. Knorr, M., Schuller, S., Steuhl, K. P., Thiel, H. J., *EGF in der Therapie von Hornhauterkrankungen.* Ophthalmologe, 1992. 89(2): p. 119-127.

33. Kobayashi, T.K., et al., *Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation.* Ophthalmologica, 1997. 211(6): p. 358-361.

34. Kruse, F.E. and S.C. Tseng, *Retinoic acid inhibits the proliferation of dividing cells in peripheral corneal epithelium.* Ophthalmologe, 1993. 90(6): p. 662-668.

35. Kruse, F.E., Tseng, S. C., *Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 und 2 hemmen die Proliferation von Limbus- und Hornhautepithel.* Ophthalmologe, 1994. 91(5): p. 617-623.

36. Lang, G. K., Amann J., Gareis O., Lang G. E., Recker D., Spraul C. W., Wagner P., *Augenheilkunde, Verstehen-Lernen-Anwenden*. 2. Auflage, Kap.5, 119-122, Thieme, Stuttgart, 2000.

37. Lopez Bernal, D., Ubels, J. L., *Artificial tear composition and promotion of recovery of the damaged corneal epithelium.* Cornea, 1993. 12(2): p. 115-120.

38. Lu, L., Reinach, P. S., Kao, W. W., *Corneal epithelial wound healing.* Exp Biol Med (Maywood), 2001. 226(7): p. 653-664.

39. McDonnell, P.J., Schanzlin, D. J., Rao, N. A., *Immunoglobulin deposition in the cornea after application of autologous serum.* Arch Ophthalmol, 1988. 106(10): p. 1423-1425.

40. Nelson, J.D., Gordon, J. F., *Topical fibronectin in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. Chiron Keratoconjunctivitis Sicca Study Group.* Am J Ophthalmol, 1992. 114(4): p. 441-447.

41. Neuwirth-Lux, O. and F. Billson, *Vitamin E and rabbit corneal endothelial cell survival.* Aust N Z J Ophthalmol, 1987. 15(4): p. 309-314.

42. Nishida, T., Nakamura, M., Ofuji, K., Reid, T. W., Mannis, M. J., Murphy, C. J., *Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea.* J Cell Physiol, 1996. 169(1): p. 159-166.

43. Nishida, T., Ohashi, Y., Awata, T., Manabe, R., *Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer.* Arch Ophthalmol, 1983. 101(7): p. 1046-1048.

44. Pancholi, S., et al., *The effects of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelial cells and keratocytes.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998. 236(1): p. 1-8.

45. Pastor, J.C., Calonge, M., *Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study.* Cornea, 1992. 11(4): p. 311-314.

46. Petty, R.D., et al., *Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number.* J Biolumin Chemilumin, 1995. 10(1): p. 29-34.

47. Pilcher, B.K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G., Parks, W. C., *The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix.* J Cell Biol, 1997. 137(6): p. 1445-1457.

48. Poon, A.C., Geerling, G., Dart, J. K., Fraenkel, G. E., Daniels, J. T., *Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies.* Br J Ophthalmol, 2001. 85(10): p. 1188-1197.

49. Rheinwald, J.G., Green, H., *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.* Cell, 1975. 6(3): p. 331-343.

50. Rieck, P.W., Sherif, Z. A.-R, Hartmann, C., Pleyer, U., *Wundheilung der Hornhaut, Teil 1:Biologische Grundlagen und ihre klinische Relevanz.* Ophthalmologe, 2003. 9(100): p. 749-770.

51. Rodeck, U., Jost, M., Kari, C., Shih, D. T., Lavker, R. M., Ewert, D. L., Jensen, P. J., *EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival.* J Cell Sci, 1997. 110 (Pt 2): p. 113-121.

52. Rohrbach, J.M., Steuhl K.-P., Knorr M., Kirchhof B., *Ophthalmologische Traumatologie*, 1. Auflage, Kap. 5, 296-302, Schattauer, Stuttgart, 2002.

53. Satterfield, D., D. Taube, and M.C. Kenney, *Effect of vitamin E on the production of collagen, DNA and fibronectin in keratocytes in vitro.* Ophthalmic Res, 1988. 20(4): p. 227-231.

54. Savage, C.R., Jr. and S. Cohen, *Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor.* Exp Eye Res, 1973. 15(3): p. 361-366.

55. Scardovi, C., De Felice, G. P., Gazzaniga, A., *Epidermal growth factor in the topical treatment of traumatic corneal ulcers.* Ophthalmologica, 1993. 206(3): p. 119-124.

56. Singh, G., Foster, C. S., *Epidermal growth factor in alkali-burned corneal epithelial wound healing.* Am J Ophthalmol, 1987. 103(6): p. 802-807.

57. Tsubota, K., Goto, E., Fujita, H., Ono, M., Inoue, H., Saito, I., Shimmura, S., *Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome.* Br J Ophthalmol, 1999. 83(4): p. 390-395.

58. Tsubota, K., Goto, E., Shimmura, S., Shimazaki, J., *Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application.* Ophthalmology, 1999. 106(10): p. 1984-1989.

59. Ubels, J.L., Iorfino, A., O'Brien, W. J., *Retinoic acid decreases the number of EGF receptors in corneal epithelium and Chang conjunctival cells.* Exp Eye Res, 1991. 52(6): p. 763-765.

60. Ubels, J.L., et al., *Evaluation of effects of a physiologic artificial tear on the corneal epithelial barrier: electrical resistance and carboxyfluorescein permeability.* Adv Exp Med Biol, 1994. 350: p. 441-452.

61. Vajpayee, R.B., et al., *Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects.* Br J Ophthalmol, 2003. 87(11): p. 1312-1316.

62. Vesaluoma, M., et al., *Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in tear fluid: a potential modulator of corneal wound healing following photorefractive keratectomy.* Curr Eye Res, 1997. 16(8): p. 825-831.

63. Wilson, S.E., Liang, Q., Kim, W. J., *Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. 40(10): p. 2185-2190.

64. Yagoubi, M.I., et al., *Effects of irrigation solutions on corneal endothelial function.* Br J Ophthalmol, 1994. 78(4): p. 302-306.

65. Yamada, K.M., Yamada, S. S., Pastan, I., *Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and contact inhibition of movement to transformed fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. 73(4): p. 1217-1221.

66. Yang, H., Sun, X., Wang, Z., Ning, G., Zhang, F., Kong, J., Lu, L., Reinach, P. S., *EGF stimulates growth by enhancing capacitative calcium entry in corneal epithelial cells.* J Membr Biol, 2003. 194(1): p. 47-58.

67. Yokoi, N., et al., *Effectiveness of hyaluronan on corneal epithelial barrier function in dry eye.* Br J Ophthalmol, 1997. 81(7): p. 533-536.

68. Young AL, C.A., Ng HK, Cheng LL, Leung GY, Lam DS, *The use of autologous serum tears in persistent corneal epithelial defects.* Eye, 2004. 18 (6): p. 609-614.

Abb. 1 Quelle: http://www.uak.medizin.uni-tuebingen.de (Tag des Zugriffs 27.05.2008)

Abb. 4 Quelle: http://www.mta-labor.info (Tag des Zugriffs: 27.05.2008)

7 Anhang

Laborgeräte

Anthos Reader 2001 (Anthos Labtecs Instruments, Salzburg)

Biotest Elisa Washer II (Biotest Diagnostics, Dreieichen)

Co2- Inkubator MCO-17AI (Sanyo, Japan)

Digitalkamera DSC-S75 (Sony, Japan)

Feinwaage BP 121 S - OCE, elektronisch (Sartorius AG, Göttingen)

Gasbrenner Gasprofi 1 Micro (WLD - Tec, Göttingen)

Gefrierschrank Ultra low temperature- freezer, MDF- U2086S (Sanyo, Japan)

Labormikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena)

Okular mit Gitternetzlinien, E-Pl 10x/20 Br (Zeiss, Jena)

Luminometer Rosys Anthos Lucy 3 Version 1.2 (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Österreich)

Magnetrührer MR 3002 (Heidolph, Kelheim)

Membran-Vakuumpumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg)

Pasteur-Pipetten zum Einmalgebrauch, Länge 150mm (Hassa, Lübeck)

Pipettboy accu (Integra Biosciences GmbH, Fernwald)

Schüttelwasserbad Thermomix 1420 (Braun, Melsungen)

Sterile Werkbank Gelaire, BSH 4A, Fa. Nicotra (Milano, Italien)

Sterilisator Sano Clav, Typ ST- MCS- 203 (Fa. Wolf, Bad Überkingen)

Thermomix 1420 (B.Braun Melsungen AG, Melsungen)

Zentrifuge Varifuge 3.2 RS (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode)

Zentrifuge Biofuge primo (Heraeus Instruments, Hanau)

HPLC Analage B von Merck/ Hitachi:

Interface: D-7000 Interface (Merck/ Hitachi)

Pumpe 1: HPLC-Pumpe Bischhoff [isokratische Pumpe]

Pumpe 2: L-6200A Intelligent Pump (Merck/ Hitachi) [Niederdruckgradientenpumpe]

Detektor: L-4500 Diode-Array Detektor

Laborbedarf

0,5 ml Reaktionsgefäße mit Deckel (NeoLab, Heidelberg)

0,5 ml Reaktionsgefäße mit Deckel (NeoLab, Heidelberg)

1 ml Einmalspritzen (Becton Dickinson, Heidelberg)

15 ml Polypropylene Conical Tube (Falcon, Heidelberg)

15ml ,konisches Gefäß, aus Polypropylen (Falcon, Heidelberg)

20 ml Einmalspritzen, sterilisiert (Becton Dickinson, Heidelberg)

24-Loch Zellkulturplatten (Nunc, Roskilde/DK)

50 ml Polypropylene Conical Tube (Falcon, Heidelberg)

6-Loch Zellkulturplatten (Nunc, Roskilde/DK)

96-Loch Zellkulturplatten Microtest (Falcon, Heidelberg)

Blutbildautomat GenS Haematology Analizer (Fa. Beckman Coulter,Krefeld)

Einwegflaschen 25, 50, 100, 250, 500ml „Duran“ (Schott, Mainz)

Filtereinheit 0,2 µm, steril (Schleicher & Schuel, Dassel)

Filtereinheit Minisart (Sartorius, Göttingen)

Microtest Zellkulturplatten, 96 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel für geringe Verdunstung (Falcon, Heidelberg)

Monovette 8,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

Monovette 8,5 ml (Sarstedt, Nürmbrecht)

Netzmikrometer 12,5 x 12,5 mm(Zeiss, Jena)

Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe (Zeiss, Jena)

Nunc - Immuno - Plate Poly Sorp - Surface, white surface (Nunc, Roskilde/DK)

Pipette Reference 100 - 1000µl (Eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen, 1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000µl (Greiner, Nürtingen)

Puderfreie Einmaluntersuchungshandschuhe aus Naturkautschuklatex (Hartmann,

Serologische Pipette 10 ml (Nunc, Roskilde/DK)

Serologische Pipette 10 ml (Nunc, Roskilde/DK)

Serologische Pipette 5 ml (Nunc, Roskilde/DK)

Serologische Pipette 5 ml (Nunc, Roskilde/DK)

Silikonzylinder Flexiperm Micro 12 (Viva Science, Göttingen)

Thermanox - Zellkultureinsätze, 13 mm Diameter (Nunc, Roskilde/DK)

Thermanox Zellkultureinsätze 13mm (Nunc, Roskilde/DK)

Trypan Blue Stain 0,4 % (Gibco, Karlsruhe)

Zellkulturflaschen (Greiner, Nürtingen)

Testkits

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

ELISA für humanes EGF (R&D Systems, Minneapolis)

ELISA für humanes VEGF (R&D Systems, Minneapolis)

ELISA für humanes PDG-AB (R&D Systems, Minneapolis)

ELISA für humanes Fibronektin (Chemicon international, Temecula, U.S.A.)

ELISA für humanes TGF-β_2 (Bender MedSystems GmbH Wien, Austria)

Zellextraktions- und Lumineszenz-Kit: DCS TCA Lite (DCS Innovative, Hamburg)

Chemikalien und sonstige Reagenzien

2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (Merck - Schuckhardt, Hohenbrunn)

Albumin, bovines (Sigma, Steinheim)

Aluminiumkaliumsulfat (Merck, Darmstadt)

Antibiotikum/Antimykotikum 100X liquid (Gibco, Grand Island, N.Y.)

APAAP- Komplex (Dianova/Immuntech, Marseille)

Aquatex (Merck, Darmstadt)

Benzalkoniumchlorid (Haltermann, Workington, Großbritannien)

$CaCl_2$ (Merck, Darmstadt)

Chloralhydrat (Merck, Darmstadt)

Chloroform (Merck, Darmstadt)

Choleratoxin (Sigma, Steinheim)

Citronensäure (Merck, Darmstadt)

Cytokeratin 3 (ICN, Aurora/Ohio/USA)

Definiertes KSFM (Gibco, Grand Island, N.Y.)

Definiertes KSFM mit Wachstumsfaktorzusatz (Gibco, Grand Island N.Y.)

Dimethylsulphoxid [DMSO] (Sigma, Steinheim)

EGF (Sigma, Steinheim)

Fetales Rinderserum (Gibco, Grand Island, N.Y)

Glutaraldehyd (Fluka, Buchs/Schweiz)

Glycergel (DAKO, Carpenteria/CA/USA)

Ham´s F12 (Biochrome, Berlin)

Hämalaun nach Mayer: Hämatoxilin, Natriumjodat, Aluminiumkaliumsulfat,

Chloralhydrat, Zitronensäure (Merck, Darmstadt)

Hämatoxylin (Merck, Darmstadt)

Hydroxyurea (Sigma, Steinheim)

Insulin (Sigma, Steinheim)

Intraokuläre Spüllösung, BSS (Chauvin, France)

Kollagen Typ I (Sigma, Steinheim)

Levamisole (Sigma, Steinheim)

Maus - Immunoglobine (DAKO, Glostrup/DK)

MEM Eagle (Gibco, Grand Island, N.Y.)

Methanol (Fisher Scientific, Loughborough, GB)

Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)

Natriumjodat (Merck, Darmstadt)

Natriumsalz-Trihydrat (Merck- Schuckhard, Hohenbrunn)

N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt)

New Fuchsin (Sigma, Steinheim)

Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)

PBS (Oxoid, Hampshire, GB)

Schweineserum (DAKO, Glostrup/DK)

Sodiumnitrit (Sigma, Steinheim)

Trishydroxymethylaminomethan (Merck, Darmstadt)

Trypan Blau (Gibco BRL, Grand Island, USA)

Trypsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin)

8 Danksagung

Diese Arbeit ist meiner Frau Svenja gewidmet. Ich danke Dir für das Vertrauen in meine Arbeit, für die Inkaufnahme der vielen Einschränkungen, die im Zusammenhang mit diesem Werk auftraten und für die Liebe, die Du mir entgegenbringst, die die wichtigste Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit war.

Meinem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Hartwig, Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, danke ich für die Hilfe bei der Standardisierung der Versuche und der zeitintensiven Betreuung der Arbeit. Für seine ständige Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die gute Betreuung möchte ich mich herzlich bedanken. Unsere Zusammenarbeit war stets ausgezeichnet, effektiv und basierte auf einem freundschaftlichen Verhältnis.

Prof. Dr. Gerd Geerling danke ich für die interessante Themenstellung und die guten Arbeitsbedingungen im Labor der Augenheilkunde. Für die Möglichkeit die Arbeit zu publizieren und auf einer Tagung zu präsentieren, bin ich dankbar.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung eines sorgenfreien Studiums. Sowohl finanziell als auch emotional wurde ich nicht allein gelassen und bin glücklich durch Ihre Hilfe so weit gekommen zu sein.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, hier insbesondere Dr. L. Dibbelt, unter dessen Leitung die Konzentration der Vitamine A und E bestimmt wurden. Auch für Zwischenfragen ohne Anmeldung hatte er stets ein offenes Ohr.

Ich danke den Mitarbeitern des anatomischen Institutes des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, insbesondere Prof. Dr. med. Thilo Wedel, der mir eine große Hilfe bei der Erstellung und Auswertung der rasterelektronischen Aufnahmen war.

Danksagung

Den Mitarbeitern des Labors der Augenheilkunde danke ich für die andauernde Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere möchte ich Frau Gudrun Müller für die Hilfestellung beim Erlernen des Umgangs mit der Zellkultur danken. Sie war immer für Fragen offen und war mir eine große Hilfe während meiner Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dipl.-Stat. Gerlinde Dahmen aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, bei Hugo Marth, graphisches Büro, des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins und bei Susanne Harloff für die arbeitsintensive Auszählung eines Teils des Differenzierungsversuches bedanken.

Dank gilt allen freiwilligen Probanden, ohne die diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

9 Lebenslauf

Name	Herminghaus
Vorname	Philipp
Geburtsdatum/-ort	25.04.1978, Hagen
Anschrift	Lärchenredder 21
	23627 Groß Grönau
Familienstand	verheiratet mit Svenja Herminghaus, geb. Wilde
Kinder	1 Sohn, Leonard
Vater	Dr. med. dent. Otto Herminghaus, Zahnarzt Dortmund
Mutter	Herma Herminghaus, verstorben 2003
Bruder	Dr. med. dent. Ingo Herminghaus, Zahnarzt Dortmund

Schulbildung

08/1984 – 06/1988	Grundschule Schraberg, Herdecke
08/1988 – 06/1997	Friedrich - Harkort - Gymnasium, Herdecke
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1997 – 09/1998	Beschäftigung als Zusteller bei der Deutschen Post AG

Hochschulbildung

10/1998 – 04/2001	Eberhard - Karls - Universität Tübingen: Studiengang Humanmedizin
03/2001	Ärztliche Vorprüfung
04/2001 – 11/2005	Fortsetzung des Studiums an der Universität Lübeck
09/2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2004	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2004 -09/2005	Praktisches Jahr:
	1. Tertial: Rheumaklinikum Bad Bramstedt, Innere Medizin
	2. Tertial: Universitätsklinikum Schleswig - Holstein, Orthopädie
	3. Tertial: Universitätsklinikum Schleswig - Holstein, Chirurgie
11/2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
01/2006 – 04/2006	Auslandsaufenthalt in den USA

07/2006 – 08/2007	Assistenzarzt der Inneren Medizin im DRK-Krankenhaus Grevesmühlen
09/2007-08/2008	Assistenzarzt der Chirurgie im DRK-Krankenhaus Mölln-Ratzeburg

Famulaturen

Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Norden
Pädiatrie, Katholisches Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg
Augenheilkunde, Universitätsklinikum Schleswig - Holstein
Hals - Nasen - Ohren – Heilkunde, Praxis, Hamburg

Sonstiges

10/1997 – 09/1998	Beschäftigung als Zusteller bei der Deutschen Post AG

10 Publikationen

Hartwig D, Herminghaus P, Wedel T, Liu L, Schlenke P, Dibbelt L, Geerling G (2005). "Topical treatment of ocular surface defects: comparison of the epitheliotrophic capacity of fresh frozen plasma and serum on corneal epithelial cells in an in vitro cell culture model." Transfus Med. 2005 Apr;15(2):107-13.

Herminghaus, P., Geerling, G., et al. (2004). "Epitheliotrophe Kapazität von Serum- und Plasmaaugentropfen Einfluss der Zentrifugation." Ophthalmologe 101(10): 998-1005

Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G (2005). "An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 243(7):706-14

Liu, L., Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K, Geerling G (2006) Corneal epitheliotrophic capacity of three different blood-derived preparations. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47(6): p. 2438-44.

Posterausstellung: “Epitheliotrophic Capacity of Blood Products for Corneal Epithelium - Influence of Centrifugation Force and Clotting”. Gerd Geerling, Philipp Herminghaus, Gudrun Müller, Thilo Wedel, Dirk Hartwig, (2002), Fort Lauderdale, Florida, the ARVO Foundation for Eye Research.

Vortrag auf der DOG-Jubiläumstagung 2002: Herminghaus P., Hartwig D., Harloff S., Dibbelt L., Wedel T., Geerling G. (Lübeck). „Einfluss der Präparation auf die epitheliotrophe Kapazität von Serum- oder Plasma-Augentropfen.

11 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
AT	Augentropfen
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Benzalconiumchlorid
bFGF	basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
BSS	Balanced Salt Solution
Ca^{2+}	Calcium
CO_2	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsufoxid
Dpt	Dioptrien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Gefrorenes Frisch Plasma
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
KFSM	Keratinocyte Serum Free Medium
MAX	Maximum
Mg^{2+}	Magnesium
MIN	Minimum
Min.	Minute
NaCl	Natriumchlorid
O_2	Sauerstoff
o. g.	oben genannt
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	platelet derived growth factor
STABW	Standardabweichung

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
USA	United States of America
z. B.	zum Beispiel