

Dissertation



Julius-Maximilian-Universität Würzburg

**Entwicklung eines Augenirritationstests
zur Identifikation aller GHS-Kategorien für den
Endpunkt Augenreizung**

**Development of an eye irritation test
to identify all GHS categories of eye irritation**

Vorgelegt von

Christian Lotz

ausgeführt am

Universitätsklinikum Würzburg

Lehrstuhl für Tissue Engineering and Regenerative Medizin



**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin**

Vorgelegt von

Christian Lotz

aus

Pforzheim

Würzburg 2018

Eingereicht am

.....
Mitglieder des Promotionskomitees

Vorsitzender: **Prof. Dr. Markus Engstler**

Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie

1. Betreuer: **Prof. Dr. Heike Walles**

Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universitätsklinikum Würzburg

Translationszentrum Regenerative Therapien

2. Betreuer: **Dr. Jörg Teßmar**

Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg

3. Betreuer: **Dr. Bart de Wever**

Präsident von ALTEXA

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Abstract

The assessment of the risk of chemicals is of crucial importance for public health. Hence, strict test procedures have been developed for toxicological evaluation of consumer products. The original animal-based test methods are being replaced by alternative methods due to new scientific findings, economic inefficiency and ethical doubts. For the toxicological endpoint of eye irritation, the first alternative test systems based on *ex vivo* or *in vitro* models have been developed. However, to date no alternative test method has been able to predict the entire spectrum of eye irritation categories specified in the globally harmonized system for the classification and labelling of chemicals (GHS). Thus, no stand-alone test methods can replace the animal-based Draize eye irritation test resulting in the need of complex integrated testing strategies. Reasons for this are the lack of key physiological characteristics of the implemented models, species specific differences and the employed destructive analysis method.

Therefore, this study tested whether a refinement of the used models or a more sensitive analytical method could improve the predictive power of the eye irritation test. First, new models of human corneal and skin epithelial cells were developed. Since a key feature of the human cornea is a lack of cornification, several parameters such as calcium and retinoic acid to reduce the cornification were investigated. In both models the formation of a stratum corneum could be prevented most effectively by shortening the culture time. Hence, the models had a more sensitive barrier comparable to the native cornea. However, only the model based on primary cornea cells showed a cornea-specific expression of the markers cytokeratin 3 and 12 as well as loricrin. Models based on skin keratinocytes retained a skin-specific phenotype. In addition, a stromal matrix was developed to allow for the generation of a full-thickness cornea model. For this a cell-seeded collagen hydrogel was chemically cross-linked via a polyethylene glycol succinimidyl glutarate generating a transparent, non-contracting stroma equivalent.

In parallel, a non-destructive highly sensitive analysis method based on impedance spectroscopy was developed that allows repeated measurements of the tissue integrity. To improve the measurement of the barrier in three-dimensional models, a new parameter, the transepithelial electrical resistance (TEER) at the frequency of 1000 Hz, the $TEER_{1000\text{ Hz}}$ was defined. By combining the developed corneal epithelial cell models with the $TEER_{1000\text{ Hz}}$ measurement, the predictivity of the eye irritation test could be increased to 78 - 100 %. Moreover, the $TEER_{1000\text{ Hz}}$ allowed for the first time to detect the persistence of irritative effects by repeated measurements in an *in vitro* model and thus to distinguish between all GHS categories. The scientific yield of this research work is therefore a new test method that can detect all GHS categories in a single *in vitro* test and holds the possibility to completely replace the Draize eye irritation test.

Zusammenfassung

Die Risikobewertung von Chemikalien ist für die öffentliche Gesundheit von entscheidender Bedeutung, weshalb strenge Testverfahren zu deren toxikologischer Begutachtung angewandt werden. Die ursprünglich tierbasierten Testverfahren werden aufgrund von neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen und wegen ökonomischer Ineffizienz sowie ethischer Fragwürdigkeit immer mehr durch alternative Methoden ohne Tiermodelle ersetzt. Für den toxikologischen Endpunkt der Augenreizung wurden bereits die ersten alternativen Testsysteme auf der Basis von ex vivo- oder in vitro-Modellen entwickelt. Jedoch ist bis dato kein alternatives Testsystem in der Lage, das gesamte Spektrum der verschiedenen Kategorien der Augenreizungen nach dem global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) vorherzusagen und damit den tierbasierten Draize-Augenreizungstest vollends zu ersetzen. Gründe hierfür sind fehlende physiologische Merkmale im Modell sowie eine destruktive Analyseverfahren.

Aufgrund dessen wurden in dieser Studie die Hypothesen getestet, ob ein verbessertes In-vitro-Modell oder eine zerstörungsfreie, hochempfindliche Analyseverfahren die Vorhersagekraft des Augenreizungstests verbessern können. Dafür wurden zunächst neue Modelle aus humanen Hornhaut- und Hautepithelzellen entwickelt. Die Modelle aus primären cornealen Zellen zeigten eine gewebespezifische Expression der Marker Zytokeratin 3 und 12 sowie Loricrin. In beiden Modellen konnte durch die Verkürzung der Kulturdauer die Ausbildung einer Hornschicht verhindert werden. Die Modelle wiesen dadurch eine sensiblere Barriere vergleichbar der nativen Cornea auf. Darüber hinaus konnte durch die chemische Quervernetzung mit Polyethylenglykolsuccinimidylglutaratester ein transparentes, nicht kontrahierendes Stroma-Äquivalent etabliert werden. Der Stroma-Ersatz konnte zur Generierung von Hemi- und Voll-Cornea-Äquivalenten eingesetzt werden und lieferte somit erste Ansatzpunkte für die Rekonstruktion der nativen Hornhaut.

Parallel dazu konnte ein zerstörungsfreies Analyseverfahren basierend auf der Impedanzspektroskopie entwickelt werden, das wiederholte Messungen der Gewebeintegrität zulässt. Zur verbesserten Messung der Barriere in dreidimensionalen Modelle wurde hierfür ein neuer Parameter, der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) bei der Frequenz von 1000 Hz, der $TEER_{1000\text{ Hz}}$ definiert, der eine genauere Aussage über die Integrität der Modelle zulässt. Durch die Kombination der entwickelten cornealen Epithelzellmodelle mit der $TEER_{1000\text{ Hz}}$ -Messung konnte die Prädiktivität des Augenreizungstests auf 78 - 100 % erhöht werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass die nicht destruktive Messung des $TEER_{1000\text{ Hz}}$ zum ersten Mal erlaubte, die Persistenz von Irritationen durch wiederholte Messungen in einem in vitro-Modell zu erkennen und somit die GHS-Kategorie 1 von GHS-Kategorie 2 zu unterscheiden. Der wissenschaftliche Gewinn dieser Forschungsarbeit ist ein neues Testverfahren, das alle GHS-Kategorien in einem einzigen in vitro-Test nachweisen und den Draize-Augenreizungstest gänzlich ersetzen kann.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
LISTE DER VERÖFFENTLICHTEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEITEN	VI
LISTE DER ABBILDUNGEN	VII
LISTE DER TABELLEN	VII
LISTE DER ABKÜRZUNGEN	VIII
1 EINLEITUNG	9
1.1 DIE ANATOMIE DES MENSCHLICHEN AUGES	9
1.2 DIE AUGENIRRITATION ALS GESUNDHEITSRISIKO	11
1.3 DIE ALTERNATIVEN TESTMETHODEN ZUR AUGENREIZUNGSTESTUNG	15
1.4 DAS OKULARE TISSUE ENGINEERING FÜR ALTERNATIVE TESTMETHODEN	18
1.5 DIE LIMITATIONEN ALTERNATIVER TESTMETHODEN.....	25
1.6 IMPEDANZSPEKTROSKOPIE ZUR MESSUNG DER CORNEA.....	26
2 ZIELSETZUNG	28
3 MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 MATERIALIEN	29
3.2 METHODEN.....	38
4 ERGEBNISSE	50
4.1 DER EINFLUSS VERSCHIEDENER ZELLQUELLEN FÜR DIE GENERIERUNG VON CORNEA-MODELLEN.....	50
4.2 DIE FABRIKATION EINES STROMA-ÄQUIVALENTS	57
4.3 DIE HERSTELLUNG VON CORNEA-ÄQUIVALENTEN.....	64
4.4 DIE IMPEDANZSPEKTROSKOPIE ALS ANALYSEMETHODE FÜR IN VITRO-TESTSYSTEME.....	65
4.5 DIE ENTWICKLUNG EINES AUGENREIZUNGSTESTS ZUR VORHERSAGE ALLER GHS-KATEGORIEN.....	69
5 DISKUSSION	76
5.1 DER ZELLURSPRUNG DEFINIERT DAS CORNEA-MODELL	76
5.2 DIE HERAUSFORDERUNGEN EINES CORNEA-ÄQUIVALENTS	79
5.3 EIN NEUER MESSPARAMETER: DER TEER-WERT BEI 1000 Hz.....	85
5.4 DER IN VITRO-AUGENREIZUNGSTEST FÜR ALLE GHS-KATEGORIEN.....	86
6 AUSBLICK	93
7 LITERATURVERZEICHNIS	VIII
8 DANKSAGUNGEN	XVIII
9 APPENDIX	XX
9.1 AFFIDAVIT.....	XX
9.2 PUBLIKATIONSLISTE	XXI
9.3 CURRICULUM VITAE	XXII

Liste der veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten

Teile der vorliegenden Dissertation sind bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

1. **Lotz C.** et al., “Replacing the Draize eye test: Impedance spectroscopy as a 3R method to discriminate between all GHS categories for eye irritation”, 2018, Nature Scientific Reports (submitted).

Teile dieser Publikationen sind in veränderter oder gleicher Form in den Kapiteln 4.1, 4.4, 4.5, 5.3 und 5.4 in dieser Dissertation dargestellt.

2. **Lotz C.** and Schmid F. F., Oechsle E., Monaghan MG., Walles H., Groeber-Becker F., “Cross-linked Collagen Hydrogel Matrix Resisting Contraction To Facilitate Full-Thickness Skin Equivalents.” 2016, ACS Applied Material Interfaces.

Reprinted with permission from Lotz C. and Schmid F. F., et al., “Cross-linked Collagen Hydrogel Matrix Resisting Contraction To Facilitate Full-Thickness Skin Equivalents.” 2016, ACS Applied Material Interfaces. Copyright 2017 American Chemical Society. Teile dieser Publikationen sind in veränderter oder gleicher Form in den Kapiteln 4.2 und 5.2 in dieser Dissertation dargestellt.

3. **Lotz C.**, Schmid F. F., Rossi A., Kurdyn S., Kampik D., De Wever B., Walles H., Groeber F. K.. “Alternative methods for the replacement of eye irritation testing.”, 2016, ALTEX Alternatives to animal experimentation.

Teile dieser Publikationen sind in veränderter oder gleicher Form in den Kapiteln 1.1, 1.2, 1.3 und 1.5 in dieser Dissertation dargestellt.

Bei allen Publikationen wurde das Einverständnis des Verlages eingeholt, die eigenen Abbildungen und den Text für die Dissertation zu verwenden. Die Publikationen 1. und 3. sind in Open Access Zeitschriften mit Creative Commons-BY Lizenz publiziert. Die Lizenzvereinbarung „Creative Commons Attribution 4.0 International“ (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) ermöglicht die Verwendung, die Adaption, die Verteilung und die Reproduktion der veröffentlichten Arbeit in jeglicher Form und in jeglichem Format.

Förderung

Im Rahmen der Nachwuchsgruppe „Standardisierte Testsysteme“ fand die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit von Evonik Industries statt.

Liste der Abbildungen

Abbildung 1: Einsatz von Tieren in der europäischen Union.	9
Abbildung 2: Anatomie des menschlichen Auges und der Cornea.	11
Abbildung 3: Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien	12
Abbildung 4: Grundprinzip des Tissue Engineerings.....	19
Abbildung 5: In vitro-Impedanzspektroskopie.....	27
Abbildung 6: Isolation und Präparation der cornealen Zellen.....	39
Abbildung 7: Charakterisierung der isolierten cornealen Epithel-, Stroma- und Endothelzellen.....	51
Abbildung 8: Charakterisierung der cornealen und epidermal generierten in vitro-Modelle.....	53
Abbildung 9: Vergleich der Epithelmodelle.	55
Abbildung 10: Cornea-Modelle kultiviert mit Calcium oder Retinsäure.	57
Abbildung 11: Kollagensynthese der primären humanen stromalen Zellen und Hautfibroblasten.....	58
Abbildung 12: Primäre humane stromale Zellen kultiviert in Kollagenhydrogelen.	59
Abbildung 13: Materialeigenschaften der PEG-SG quervernetzten Kollagenhydrogele.....	61
Abbildung 14: Biologische Begutachtung der PEG-SG quervernetzten Kollagenhydrogele.....	63
Abbildung 15: Das Hemi-Cornea-Modell.....	64
Abbildung 16: Das Voll-Cornea-Äquivalent.	65
Abbildung 17: Impedanzspektroskopische Untersuchung der in vitro-Cornea-Modelle.	66
Abbildung 18: Impedanzspektroskopie-Messkammer.	67
Abbildung 19: Messgenauigkeit der Messplätze in der Impedanzspektroskopie-Messkammer.	68
Abbildung 20: Augenreizungstest angelehnt an die OECD TG 492.	71
Abbildung 21: Augenreizungstest mithilfe der TEER _{1000 Hz} -Messung.....	73
Abbildung 22: Wiederholte TEER _{1000 Hz} -Messungen im mRHE-Modell zur Unterscheidung der GHS-Kategorien für Augenirritation.	75
Abbildung 23: TEER _{1000 Hz} -Prädiktionsmodell zur Klassifizierung der GHS-Kategorien für die Augenirritation.....	90

Liste der Tabellen

Tabelle 1: Liste der Abkürzungen	VIII
Tabelle 2: Klassifikationsschema nach dem UN GHS für Augenirritation.....	13
Tabelle 3: Liste der Ausstattung.....	29
Tabelle 4: Liste der Einwegartikel	30
Tabelle 5: Liste des Labormaterials.....	32
Tabelle 6: Liste der Chemikalien und Lösungen.....	32
Tabelle 7: Liste der Medien und Lösungen für die Zellkultur	35
Tabelle 8: Liste der Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie	36
Tabelle 9: Antikörperliste	36
Tabelle 10: Programm zur Paraffineinbettung.....	43
Tabelle 11: Deparaffinierungs- und Rehydrierungsprotokoll.....	44
Tabelle 12: Protokoll HE-Färbung.	44
Tabelle 13: Protokoll Immunfluoreszenzfärbung.	45
Tabelle 14: Liste der Testsubstanzen für den Augenreizungstest.....	49
Tabelle 15: Zusammenfassung der gefärbten Marker der verschiedenen Modelle und nativen Gewebe.....	56
Tabelle 16: Liste der Impedanzspektroskopie-Messkammerbauteile.....	68
Tabelle 17: Kategorisierung der getesteten Substanzen mit dem TEER _{1000 Hz} -Prädiktionsmodell.	91

Liste der Abkürzungen

Tabelle 1: Liste der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ATCC	American Type Culture Collection
BCOP	Bovine Cornea Trübungs- und Permeabilitätstest
CAS	Chemical Abstract Service
CM	Cytosensor Microphysiometer-Test
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
et al.	Et alia
EURL ECVAM	Referenzlabor der Europäischen Union für Alternativen zum Tierversuchen
FL	Fluorescein Auslaufstest
GHS	Global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
HE	Hämatoxylin-Eosin
Het-CAM	Hühnerei-Test
ICCVAM	Amerikanischen Behörde für Validierung von alternativen zu Tierversuchen
ICE	Isolierter Hühneraugen-Test
IRE	Isolierter Kaninchenaugen-Test
KHG	Kollagenhydrogel
LDH	Laktatdehydrogenaseaktivität
mRHE	Modifizierte rekonstruierte humane Epidermis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG-SG	Polyethylenglykolsuccinimidylglutaratester
PorCORA	Porcine corneale Reversibilitätstest
QSAR	Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung
RCE	Rekonstruiertes humanes Corneal-Epithel
RHE	Rekonstruierte humane Epidermis
TEER	Transepitheliale elektrische Widerstand
TG	Testrictline
UN	Vereinten Nationen

1 Einleitung

Das menschliche Auge ist für die optische Wahrnehmung unserer Umwelt zuständig. Damit Licht die sensorischen Zellen der Retina erreicht, ist das Auge nur durch ein dünnes und transparentes Gewebe, die Cornea, geschützt. Im Vergleich zur Epidermis der Haut ist die Cornea nicht verhornt und deshalb anfälliger für mechanische und chemische Verletzungen. Aufgrund der zentralen Bedeutung unseres Sehens und seiner Verletzlichkeit wurden standardisierte Testprotokolle entwickelt, um die potentielle Schädlichkeit von chemischen Substanzen und Konsumgütern für das menschliche Auge einzuschätzen (Abbildung 1).

Der derzeitige Goldstandard hierfür ist der Draize-Augenreizungstest, bei dem das Gefahrenpotential von Chemikalien mithilfe von lebenden Albino Kaninchen eingeschätzt wird. Jedoch kam es aufgrund wissenschaftlicher und ethischer Bedenken zu Änderungen in der Gesetzgebung und die Forderungen nach dem Ersatz von Tierversuchen durch alternative Methoden mehren sich in den westlichen Gesellschaften. Die Alternativen zum Tierversuch können anhand der Modelle *in silico*, *ex vivo* und *in vitro* eingeteilt werden. Für die Modellierung der Testmethode ist es wichtig, die Anatomie des Auges und die Interaktion von Chemikalien mit dem Gewebe zu verstehen. Darüber hinaus könnten alternative Testsysteme die Prädiktion der toxikologischen Testungen verbessern¹.



Abbildung 1: Einsatz von Tieren in der europäischen Union. 1 004 873 beziehungsweise 8,75 % der 11,5 Millionen Tiere wurden für toxikologische und andere Sicherheitsprüfungen in 2011 in der europäischen Union eingesetzt.

1.1 Die Anatomie des menschlichen Auges

Wirbeltiere haben ein hoch sensibles optisches Sinnesorgan zur Orientierung und Kommunikation entwickelt. Da die Funktion des Auges einer exponierten Lage bedarf, hat die Evolution mehrere Schutzmechanismen entwickelt. Eingebettet in Muskeln, Fett und Bindegewebe in der Orbita des menschlichen Schädels, ist der Bulbus oculi gut gegen mechanische Einwirkungen geschützt. Weiteren Schutz bietet der Aufbau des Auges

selbst. Die drei Schichten des Auges, äußere (Tunica fibrosa bulbi), mittlere (Uvea) und innere Augenhaut (Retina) umgeben den Glaskörper (Corpus vitreum). Die äußere Schicht, Tunica fibrosa bulbi, gibt dem Auge Form und besteht aus Lederhaut (Sclera) und Hornhaut (Cornea)². Die Sklera ist ein dickes milchiges Gewebe, das 95 % des Auges bedeckt und vor inneren und äußeren Einwirkungen schützt. Die Sklera dient des Weiteren als Ansatzpunkt für die Skelettmuskulatur. Die Cornea bildet den äußeren vorderen Teil des Auges und ist transparent, damit Licht ins Auge durch die Linse und auf die Retina treffen kann. Sie umfasst 11 mm im Durchmesser, ist 400 - 600 µm dick und enthält keine Blutgefäße. Da die Cornea die äußerste und funktional wichtigste Barriere des Auges ist, wird sie bevorzugt zur Testung der Augenirritation eingesetzt. Die Cornea wird in fünf Schichten untergliedert: (I) vorderes Hornhautepithel (Epithelium corneae), (II) Bowman-Membran (Lamina limitans anterior), (III) Stroma (Substantia propria), (IV) Descement-Membran (Lamina limitans posterior), (V) Cornea-Endothel (Endothelium corneae) (Abbildung 2)². Das mehrschichtig unverhornte Epithel besteht aus 5 - 7 Zellschichten mit hoher mitotischer Aktivität, die zu einer Erneuerung aller Zellen innerhalb von 7 - 10 Tagen führt³. Es dient als Barriere für Pathogene und verhindert die Dehydratation des Stromas durch eine Vielzahl an Zell-Zell-Kontakten. Die Bowman-Membran ist eine dünne (10 - 15 µm), zellfreie Schicht aus Kollagen I und V. Sie separiert das Epithel vom Stroma. Das Stroma ist mit 500 µm Dicke der größte Teil der Cornea und gewährleistet deren strukturelle Integrität. Es wird von den stromalen Zellen beziehungsweise Keratozyten produziert und ist ein hochorganisiertes Netzwerk aus Kollagen, um die Transparenz des Gewebes zu gewährleisten. In 100 - 200 Lamellen bilden die hauptsächlich Kollagen Typ I-Fibrillen ein streng parallel und orthogonal ineinander verwobenes Netz, das die Transparenz und Stabilität der Cornea ausmacht⁴. Die Descement-Membran ist ähnlich wie die Bowman-Membran eine zellfreie, 5 - 15 µm dicke Schicht aus Kollagen Typ IV und VIII, die das Stroma vom Endothel trennt⁵. Sie wird von dem einschichtigen Endothel gebildet. Das Endothel besteht hauptsächlich aus hexagonalen Endothelzellen. Im Alter nimmt die Anzahl der Endothelzellen ab und die Zellen verlieren ihre hexagonale Form aufgrund von Hypertrophierung. Das Endothel ist in direktem Kontakt mit dem Kammerwasser der vorderen Augenkammer, über den sie den Stoffwchelsaustausch für die Cornea sichert^{1,2}.

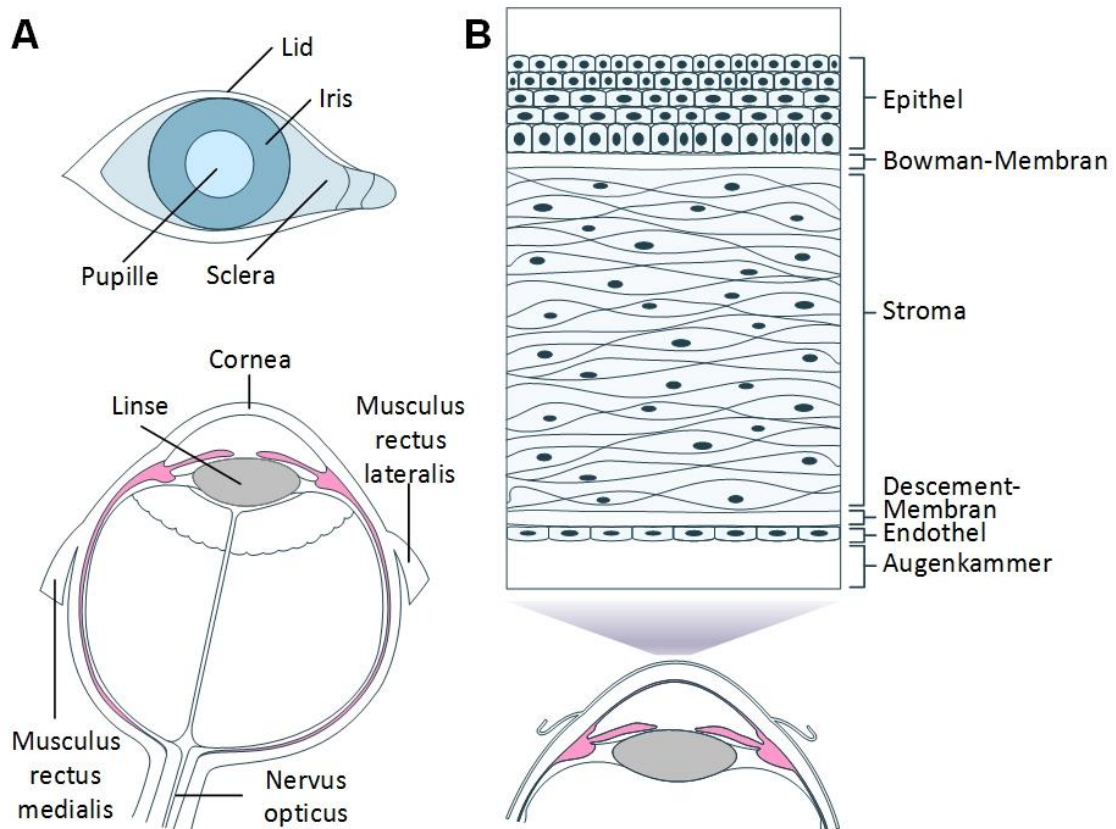


Abbildung 2: Anatomie des menschlichen Auges und der Cornea. (A) Frontansicht und Querschnitt des menschlichen Auges. (B) Aufbau der menschlichen Cornea.

1.2 Die Augenirritation als Gesundheitsrisiko

1.2.1 Mechanismus der Augenirritation

Tausende Substanzen in Pharmaka und Kosmetika, aber auch anderen Konsumgütern sind in der Lage, das Auge zu irritieren oder zu verletzen. Deshalb ist das Risikomangement eine wichtiger Bestandteil des Gesundheitswesens⁶.

Die Verursacher der Augenirritation können nach ihren spezifischen molekularen Mechanismen eingeteilt werden⁷. Dabei werden Zellschäden durch eine Vielfalt an chemischen Reaktionen ausgelöst. Der Zusammenbruch der Zellmembran zum Beispiel durch Tenside führt zur Zellmembranlyse. Die Denaturierung und Koagulation von Makromolekülen, insbesondere von Proteinen durch Säuren, Basen oder organischen Lösungsmitteln führen zu Zellschädigungen. Zellmembranlyse und Koagulation durch Verseifung, also die Hydrolyse von Lipiden durch Basen, sind eine weitere Ursache für Augenirritationen. Alle Chemikalien, die mit zellulären Komponenten reagieren wie Alkylierung oder Oxidation von Makromolekülen sind in der Lage, Zellstress, Koagulation und Zelllyse zu verursachen. Man kann bei diesen Gruppen von einer verzögerten Reaktion ausgehen, da die erste Reaktion oft unauffällig verläuft (Peroxide und Bleichmittel)^{1,8-10}. Die

zugrunde liegenden Mechanismen sind für die Entwicklung von Testsystemen von besonderer Bedeutung, um diese im Modell zu rekapitulieren und mit der Analysemethode erfassbar und messbar zu machen. Für die Einstufung des Gefahrenpotentials ist dieses System jedoch zu komplex und die Vereinten Nationen (UN) haben deshalb ein leicht verständliches, einheitliches System entwickelt.

1.2.2 Das global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien für die Augenirritation

Zum Verbraucherschutz müssen alle potentiell gefährlichen Stoffe für das Auge auf den Produkten gekennzeichnet werden. Das global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien für die Augenirritation (GHS) definiert zwei Kategorien für Augenirritation. Substanzen, die keine nachteilige Wirkung für das Auge haben, benötigen keine Kennzeichnung (keine Kategorie). Hingegen werden Chemikalien, die einen reversiblen Effekt wie etwa Augenreizung hervorrufen, in Kategorie 2 eingeordnet. Irreversible Effekte beziehungsweise Schäden werden in Kategorie 1 eingestuft und als schwere Augenschädigung bezeichnet. Je nach Dauer des Effekts wird von den Vereinten Nationen die Kategorie 2 nochmals in zwei Subklassen unterteilt. Ist der Effekt nach 7 Tagen abgeklungen, spricht man von einer milden Irritation, Kategorie 2B. Dauert der Effekt über 21 Tage, geht man von einer schwerwiegenden Irritation, Kategorie 2A, aus. Diese Subkategorisierung in Kategorie 2A und 2B wurde jedoch nicht von der Europäischen Union übernommen. (Abbildung 3).

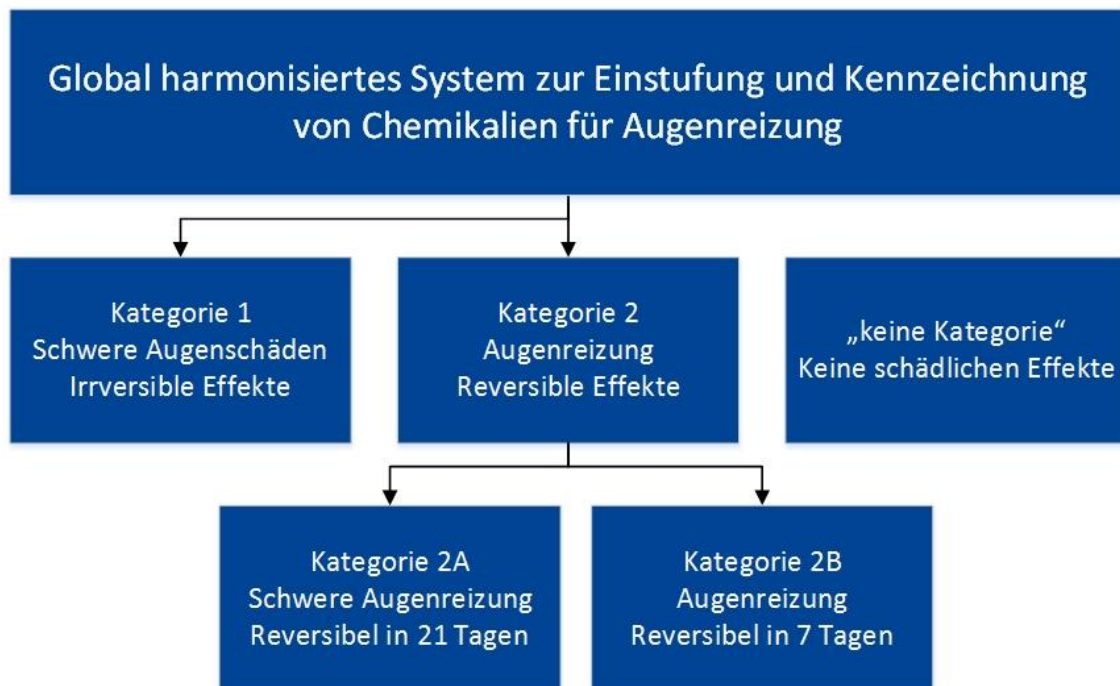


Abbildung 3: Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien für den Endpunkt Augenreizung.

Zur Einordnung in die drei Kategorien wurden verschiedene in vivo-, ex vivo- und in vitro-Testsysteme entwickelt, von denen der Draize-Augenreizungstest als die Referenzmethode seit den 50iger Jahren gilt^{1,11,12}.

1.2.3 Der Draize-Augenreizungstest

Wie in den 50iger Jahren üblich, wurde die Augenirritation an Tieren wie Kaninchen getestet. Methodisch gesehen, gab es unterschiedliche Ansätze, bis 1944 der Toxikologe John H. Draize von der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Food and Drug Administration, FDA) einen standardisierten Test veröffentlichte. Diese Methode verbreitete sich in Fachkreisen schnell weltweit und ist als der Draize-Augenreizungstest bis heute bekannt und im Einsatz¹¹.

Zur Prüfung setzt der Test Albino-Kaninchen ein, um das Gefahrenpotential von Substanzen für das menschliche Auge zu evaluieren. Im ursprünglichen Test wurde ein Volumen von 0,01 - 0,1 ml der Testsubstanz ins Auge von drei bis sechs Kaninchen appliziert. Bei Verwendung von Feststoffen wurden diese kleingemahlen und anschließend aufgetragen. Die Substanzen wurden dem fixierten, aber wachen Tier in den Bindehautsack der Konjunktiva appliziert. Blinzeln war erlaubt, wobei die Augenlider für mehrere Sekunden zugehalten werden durften, um die Auftragung zu verbessern. Die Augen wurden nach der Applikation in der Regel im Rhythmus von 1 Stunde, 1 Tag sowie 3 Tagen untersucht; dieses Verfahren konnte bis auf 21 Tage ausgeweitet werden. Alle Anzeichen von kornealer Trübung, Iritis, konjunktivaler Rötung oder konjunktivaler Chemosis wurden aufgezeichnet und nach Schweregrad in einer Wertungstabelle eingestuft. Nach den Versuchen werden die Tiere euthanasiert¹². In Übereinstimmung mit der GHS werden die Substanzen mithilfe der Wertungstabelle in zwei Kategorien eingeteilt: Kategorie 1 ist definiert durch einen Draize-Wert korneale Trübung ≥ 3 und / oder Iritis $> 1,5$ und / oder durch die Persistenz eines Wertes > 0 an Tag 21; Kategorie 2 ist definiert durch einen Draize-Wert $1 \leq$ korneale Trübung < 3 und / oder $1 \leq$ Iritis $\leq 1,5$ und / oder konjunktivale Rötung ≥ 2 und / oder konjunktivale Chemosis ≥ 2 (Tabelle 2)¹³.

Tabelle 2: Klassifikationsschema nach dem UN GHS für Augenirritation

Endpunkt	Bewertungsbereich	GHS Kategorie 1	GHS Kategorie 2*
Korneale Trübung (KT)	0 - 4	KT ≥ 3 und/ oder	$1 \leq$ KT < 3 und/ oder
Iritis (IR)	0 - 2	IR ≥ 3	$1 \leq$ IR $< 1,5$ und/ oder
Konjunktivale Rötung (KR)	0 - 3		KR ≥ 2 ; und/ oder
Konjunktivale Chemosis (KC)	0 - 4		KC ≥ 2 ; und/ oder

*Alle Effekte müssen innerhalb von 21 Tagen wieder abgeklungen sein.

Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) nahm den Draize-Augenreizungstest 1981 in Testrichtlinie (TG) 405 auf. Die Richtlinie wurde im Anschluss noch viermal überarbeitet und zwar in 1987, 2002, 2012 und 2017¹². Die Verbesserungen beinhalten eine vorangehende Analyse vorhandener Daten, um die Notwendigkeit des Tests zu gewährleisten, den Einsatz von Analgetika und Anästhetika, um das Leiden der Tiere zu reduzieren und eine sequentielle Teststrategie, beginnend mit nur einem Tier, um die Gesamtanzahl der eingesetzten Tiere zu reduzieren¹². Zusätzlich wurde noch eine Variante mit einem geringeren Substanzvolumen entwickelt. Bei dem sogenannten „low volume eye test“ werden nur 10 µl direkt auf die zentrale Cornea appliziert. Die Absicht hinter dieser Variante war, dass es besser die menschliche Antwort wiederspiegeln würde, da man dachte der Draize-Augenreizungstest würde das Gefahrenpotential für das menschliche Auge überschätzen¹⁴.

Trotz dieser Verbesserungen steht der Draize-Augenreizungstest aus wissenschaftlicher, ökonomischer und ethischer Sicht in der Kritik¹⁵. Die Hauptkritikpunkte sind in der Methodik selber zu finden: Speziesunterschiede zwischen den menschlichen Augen und denen der Kaninchen, die Benutzung und die Interpretation der Wertungstabelle, Reproduzierbarkeit und Relevanz der Ergebnisse sowie ökonomische Kosten und ethische Bedenken^{6,15-19}. Zudem gibt es neue Verordnungen wie zum Beispiel die der EG Nr. 1907/2006: „Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals“ (REACH), die einerseits den Einsatz von Tierversuchen noch vervielfachen werden, andererseits aber auch die Entwicklung von Alternativen zu Tierversuchen fordern, um die öffentliche Gesundheit vor Produkten ohne Unbedenklichkeitsgutachten durch toxikologische Untersuchungen zu schützen²⁰.

Ursprünglich wurde der Draize-Augenreizungstest zur Untersuchung der Wirkung von Pharmaka und Kosmetika entwickelt und deckt deshalb nicht das gesamte toxikologische Spektrum der Chemikalien und Expositionsformen ab. Expositionszeit und Konzentrationen unterschieden sich von angenommenen menschlichen Expositionen durch Unfälle. Hinzu kommt, dass die Bewertung selbst nur auf makroskopisch ausgesuchte und gewichtete Merkmale Rücksicht nimmt und nicht-makroskopische Aspekte komplett vernachlässigt¹⁷.

Nur die Ergebnisse aus Kategorie 1 (73 % Reproduzierbarkeit) oder von nicht kennzeichnungspflichtigen Substanzen (93 % Reproduzierbarkeit) weisen eine vermeintlich geringe Varianz auf, da hier keine oder stark ausgeprägte biologische Reaktionen vorliegen, die makroskopisch leichter zu identifizieren sind; im Gegensatz zu milden oder leicht reizenden Substanzen (15,5 %-32,9% Reproduzierbarkeit), die häufig zu mehrdeutigen Ergebnissen führen^{6,21,22}. Generell sind tierische Modelle umstritten, weil sie physiologische und anatomische Unterschiede zum Menschen vernachlässigen. So unterscheidet

sich das Kaninchen- vom Menschaugenauge durch eine andere Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit und eine größere korneale Fläche bei einer insgesamt dünneren Cornea ohne Bowman-Membran¹⁶. Auch Applikationsort, Geschwindigkeit der Substanzgabe sowie der tierische Augenreflex während der Substanzapplikation haben signifikanten Einfluss auf das Ergebnis²¹. Dazu kommt die subjektive Einschätzung des Schweregrades durch den Experimentator, die zu Fehleinschätzungen führen kann^{17,23,24}. Hieraus ergeben sich dann unterschiedliche Ergebnisse zwischen Laboren und eine schlechtere methodische Reproduzierbarkeit. Selbst wenn dieses Problem durch eine größere Versuchstieranzahl verbessert werden könnte, ist es weder ökonomisch noch ethisch erstrebenswert.

1.3 Die alternativen Testmethoden zur Augenreizungstestung

Aus wissenschaftlichen, ethischen und ökonomischen Gründen ist die Entwicklung von Alternativen zum Tierversuch dringend benötigt. Dies realisierte unter anderem das in 2013 erlassene Verbot kosmetische Produkte auf dem europäischen Binnenmarkt zu verkaufen, die an Tieren getestet werden²⁵. Deshalb unterstützt und entwickelt die Industrie alternative Methoden, um neue Produkte auf den europäischen Markt bringen zu können. Dies geschieht im Einklang mit der EU-Richtlinie REACH, damit die prognostizierten millionenfachen Tierversuche durch alternative Methoden reduziert werden²⁶. Die alternativen Methoden können anhand des Modellsystems, das verwendet wird, um das Gefahrenpotential vorherzusagen, eingeteilt werden. In silico-Maßnahmen nutzen computerbasierte Verfahren, um mithilfe bekannter Daten das Gefahrenpotential anderer Chemikalien mit ähnlichen molekularen Strukturen vorherzusagen. Ex vivo-Tests nutzen tierische Gewebe und in vitro-Tests setzen Proteine, Zellen und in vitro generierte Gewebe ein, um die Schädlichkeit einer Substanz zu bestimmen. Im Folgenden werden die am weitesten entwickelten Testverfahren anhand ihres Testmodells vorgestellt.

1.3.1 In silico-Tests

In silico-Modelle können ein einfacher erster Schritt sein, um Chemikalien zu analysieren und zu kategorisieren. Sie benötigen keine Tiere, sind günstig und kommen innerhalb von Minuten zu einem Ergebnis. Die quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung (Quantitative structure–activity-relationships, QSAR) wird eingesetzt, um den biologischen Effekt einer ungetesteten Chemikalie durch deren strukturelle Ähnlichkeit zu einer bekannten Chemikalie analog abzuleiten. Chemische Datenbanken könnten theoretisch durch programmierte Algorithmen die Toxizität einer ungetesteten Chemikalie anhand ihrer molekularen Struktur vorhersagen. Es sind bereits verschiedene geprüfte Softwarepakete verfügbar. In silico-Verfahren sind vor allem durch die Qualität und der Quantität der verfügbaren Daten limitiert. Die Daten stammen in der Regel aus Tierversuchen, ex vivo-

oder in vitro-Experimenten. Das ist auch der Grund, warum in silico-Methoden nicht allein für sich selbst funktionieren. Die Grundidee ist die computergestützte Analyse in Verbindung mit anderen Methoden einzusetzen, um wesentliche Endpunkte zu erkennen, anstatt das komplette toxikologische Spektrum einer Chemikalie zu prognostizieren²⁷.

1.3.2 Ex vivo-Tests

Schon in den 1980iger und 1990iger Jahren wurden Multilaborstudien durchgeführt, um Alternativen zum Draize-Augenreizungstest zu finden¹¹. Während dieser Studien wurden organotypische Modelle eingeführt, um das Augenreizungspotential zu evaluieren. Die Verfahren benötigen keine lebenden Tiere, aber nutzen Corneas, die post mortem von Tieren gewonnen werden. Damit sind organotypische Methoden keine Tierversuche nach geltender Rechtsgrundlage. Am häufigsten werden Rinder-, Kaninchen- oder Hühneraugen zur Evaluation des Augenreizungspotential eingesetzt.

Der bovine Cornea Trübungs- und Permeabilitätstest (Bovine corneal opacity and permeability test, BCOP) verwendet Rinderaugen von Schlachttieren, die entkernt ins Labor gebracht, auf Defekte untersucht, vom Rest des Auges isoliert und in einer Hornhautkammer fixiert werden. Zur Testung werden die Rinderhäute für 10 Minuten Flüssigkeiten und für 4 Stunden Feststoffen ausgesetzt. Anschließend werden sie gespült und für 2 Stunden inkubiert. Toxische Effekte der Testsubstanz auf die Hornhaut werden durch die Fähigkeit, Trübung und erhöhte Permeabilität zu induzieren, gemessen. Die Hornhauttrübung wird quantitativ durch die Menge der Lichttransmission durch die Hornhaut gemessen. Natriumfluorescein-Farbstoff, der alle Schichten der Hornhaut passiert und die untere Kammer erreicht, liefert Informationen über die Permeabilität des Gewebes. Die Methode wurde 2009 als OECD-Richtlinie anerkannt und 2013 aktualisiert^{28,29}. Der BCOP-Assay ist geeignet schwere Augenschäden (GHS, Kategorie 1) und nicht irritierende Substanzen („keine Kategorie“) vorherzusagen. Anstelle von Rinderhornhäuten haben Piehl et al. porcine Corneas für den sogenannten okularen Reversibilitätstest eingesetzt (Ocular reversibility assay, PorCORA)³⁰. Porcine Corneas ähneln dem menschlichen Auge in Dicke und Struktur eher als die von Kaninchen. Dieser Test hat Potential für die Risikobewertung, da er in einer Studie die GHS-Kategorien 1 und 2 unterscheiden konnte³¹. Der Test wurde jedoch nicht offiziell validiert und von den Zulassungsbehörden angenommen.

Der Hühnerei-Test (Hen's egg test - chorioallantoic membrane, Het-CAM) verwendet kein korneales Gewebe, sondern die Chorioallantoismembran von befruchteten Hühnereiern. Die Eier können bis zum zehnten Tag nach der Befruchtung verwendet werden, da die Entwicklung des embryonalen Nervensystems nicht vor diesem Tag abgeschlossen ist. Es wird angenommen, dass das Testmaterial ähnliche Wirkungen auf die Membran wie auf das Auge hat. Die Testsubstanz wird nach der Möglichkeit klassifiziert, Hämorrhagie, Lyse und Koagulation der Blutgefäße in der Membran zu verursachen. Somit ist

der Het-CAM-Test die einzige organotypische Methode, die direkt konjunktivale Effekte adressiert. Ursprünglich entwickelt von Luepke et al. zeigt der Test eine hohe Vorhersagbarkeit für milde und nicht reizende Testmaterialien^{32,33}. Der Het-CAM-Test ist validiert, wird aber nicht von der amerikanischen Behörde für Validierung von Alternativen zu Tierversuchen (Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) empfohlen. Mit der Begründung das Alkohole, klebrige Materialien, farbige Chemikalien und Feststoffe, die physikalischen Abrieb verursachen, anfällig für Fehlklassifizierungen sind.

Beim isolierten Hühneraugen-Test (isolated chicken eye test, ICE) und isolierten Kaninchenaugen-Test (isolated rabbit eye test, IRE) werden die Augen von Hühnern beziehungsweise Kaninchen entnommen, entkernt und die zu testenden Substanz auf die Cornea aufgetragen. Die toxischen Effekte werden anhand der Trübung, Schädigung des Epithels und der Quellung der Cornea ausgewertet.

Zwischen 2003 und 2006 wurde eine retrospektive Validierungsstudie von vier organotypischen Testsystemen BCOP, Het-CAM, ICE- und IRE-Test durchgeführt, in der die Fähigkeit dieser Assays, schwere Augenreizungen zu erkennen, untersucht wurde. Zwei Testmethoden, der BCOP- und der ICE-Test, wurden im Rahmen eines Top-Down-Ansatzes wissenschaftlich validiert, um Augen schädigende und schwere Reizstoffe zu identifizieren, die 2009 zu zwei OECD-Richtlinien führten^{28,34,35}. Im April 2013 erweiterten die aktualisierten Testrichtlinien den Einsatz von BCOP- und ICE-Testmethoden in einem Bottom-up-Ansatz, um bestimmte Chemikalien als nicht kennzeichnungspflichtige zu erkennen. Für den ICE-Test treten jedoch hohe falsch-positive Ergebnisse für Alkohole und hohe falsch-negative Ergebnisse für Feststoffe und Tenside auf³⁶. Für den BCOP-Assay wurden hohe falsch-positive Raten für Ketone, Feststoffe, Alkohole und nicht reizende Substanzen gefunden²⁹.

Organotypische Methoden bieten eine dreidimensionale Umgebung in der die Struktur und Funktion des Auges erhalten sind. Dennoch sind diese Testsysteme auf tierisches Gewebe angewiesen und mit den gleichen Artunterschieden konfrontiert wie die in vivo-Versuche. Um diese Limitation zu umgehen und kein tierisches Material zu verwenden, wurden verschiedene zweidimensionale in vitro-Testsysteme aus menschlichen Zellen entwickelt.

1.3.3 In vitro-Tests

1.3.3.1 Zweidimensionale Zell-Tests

Zellbasierte Testsysteme werden auf der Grundlage eingesetzt, dass irritierende Substanzen auch zytotoxische Effekte an bestimmten Zelltypen aufweisen. Die Zellschäden können durch Koagulation von Makromolekülen, Zellmembranlysis, Verseifung von Lipiden, Alkylierung und \ oder kovalenten Reaktionen mit Makromolekülen entstehen^{10,37,38}.

Zellfunktionstests sind simpel, schnell und wegen der geringen Kosten hervorragend für Hochdurchsatz-Screenings geeignet.

Der Cytosensor Microphysiometer-Test (CM) evaluiert den Einfluss von Testsubstanzen auf die metabolische Aktivität von L929 Mausfibroblasten, um Rückschlüsse auf deren Augenreizungspotential zu gewinnen. Die Zellen werden ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz ausgesetzt, gewaschen und deren metabolische Aktivität über die extrazelluläre Azidifizierung gemessen. Der CM-Assay ist für die Identifizierung von nicht GHS-kennzeichnungspflichtigen und zur GHS-Kategorie 1 gehörenden Substanzen empfohlen. 2012 wurde ein OECD-Entwurf erstellt, der noch zur Diskussion steht ³⁹.

Der Neutralrot-Freigabe-Assay (Neutral red release assay) macht sich zunutze, dass Zellen den Farbstoff Neutralrot inkorporieren und in den Lysosomen binden. Zytotoxische Prozesse verhindern diese Aufnahme. Der Assay wurde erfolgreich in Kombination mit dem Het-Cam und IRE getestet, um Materialien, die schwere Augenreizungen hervorrufen, zu identifizieren⁴⁰⁻⁴².

Der Fluorescein Auslaufstest (Fluorescein leakage assay, FL) wird als in vitro-Methode eingesetzt, um wasserlösliche oder Suspensionen von korrosiven oder augenschädigenden Substanzen zu evaluieren. Madin Darby Kidney CB 997 tubuläre Epithelzellen werden hierfür in einem Transwell-System bis zur Konfluenz kultiviert. Die Permeabilität ist erhöht, wenn die Testsubstanz die Zona occludens (Tight junctions) stört. Der FL-Test wurde 2012 in die OECD-Testrichtlinie 460 aufgenommen. Der Test ist nicht geeignet, um farbige, visköse, starke Säuren oder Basen, Zellfixanzien oder sehr flüchtige Substanzen zu evaluieren ⁴³.

Die zweidimensionalen Zellkulturen der in vitro-Testverfahren konnten mithilfe des Tissue Engineerings zu dreidimensionalen Geweben weiterentwickelt werden.

1.4 Das okulare Tissue Engineering für alternative Testmethoden

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, das Ingenieurs- und Lebenswissenschaften verbindet, um menschliches Gewebe aus der Retorte herzustellen. Ursprünglich geboren aus der Idee, Gewebeversagen zu reparieren und durch individuelle Implantate zu ersetzen, bietet Tissue Engineering darüber hinaus die Möglichkeit, komplexe Gewebe als Testsysteme einzusetzen und Tierversuche zu reduzieren.

Um ein Gewebe herzustellen, werden verschiedene Zelltypen, eine Nährstoffversorgung und Trägerstrukturen kombiniert (Abbildung 4). Die Zellen werden aus Biopsien, Zelllinien oder aus differenzierten Stammzellen gewonnen. Nach der Expansion der Zellen können diese auf die Trägerstruktur, die aus synthetischen oder organischen Material bestehen kann, ausgesät werden, um die Gewebearchitektur nachzubilden. Bioreaktoren

können weitere dynamische Aspekte wie Blutfluss oder Peristaltik evozieren⁴⁴. Die Gewebearchitektur und Zellbiologie sind die Grundbausteine, um repräsentative Gewebemodelle für eine bestimmte Fragestellung zu erzeugen. Mithin erscheint es für diesen wissenschaftlichen Ansatz naheliegend, vielversprechend und aussichtsreich, das Tissue Engineering als probate Methode der Wahl einzusetzen, um ein neues, quantitativ vereinfachendes, qualitativ ökonomisch und ethisch verbessertes alternatives Testsystem für die Augentoxikologie zu gewinnen.

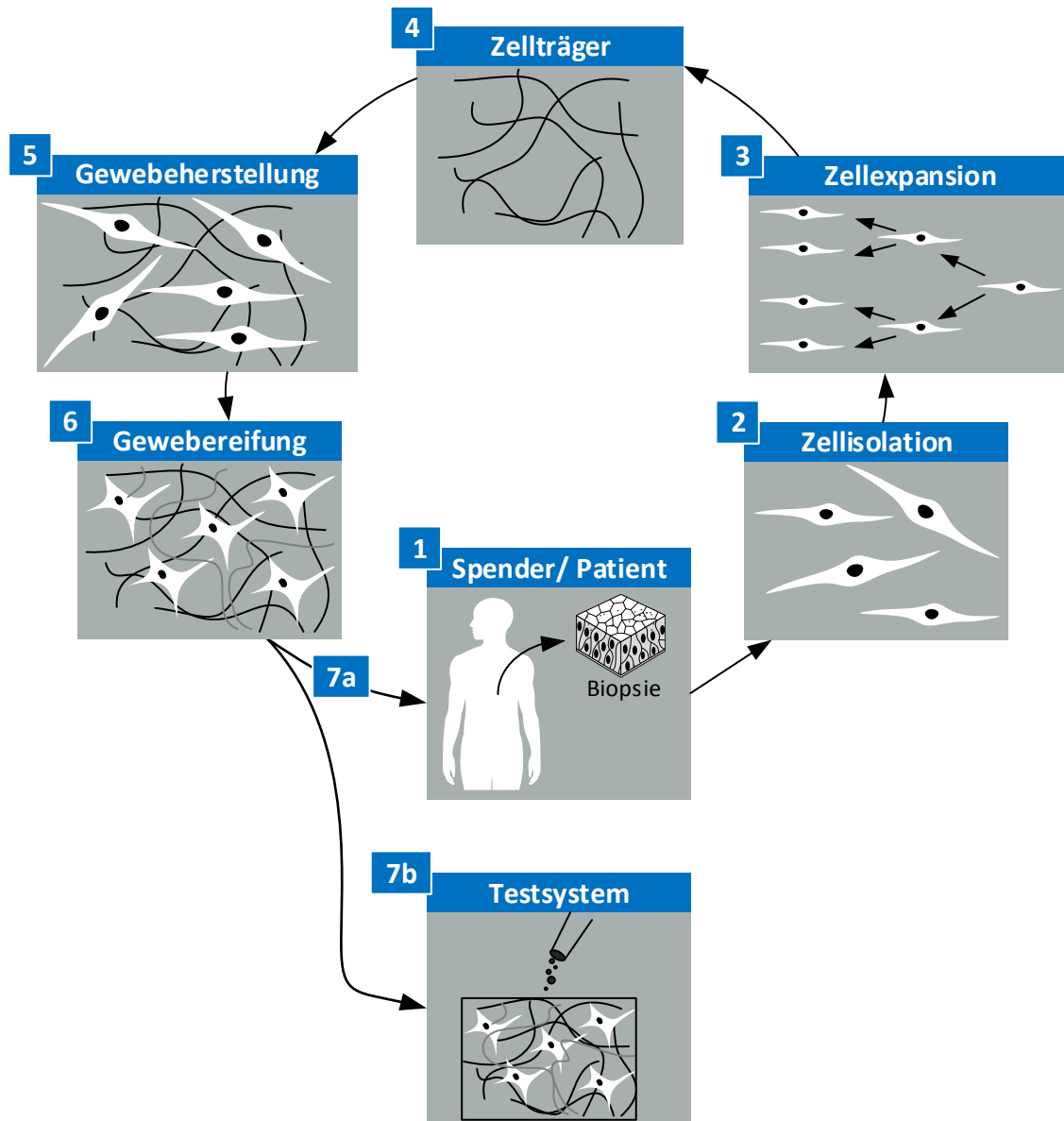


Abbildung 4: Grundprinzip des Tissue Engineerings. Dargestellt sind die Hauptschritte im Tissue Engineering-Prozess, um menschliche Implantate oder Testsysteme herzustellen⁴⁵.

1.4.1 Dreidimensionale Cornea-Epithelmodelle

Organotypische und zellbasierte Tests sind vielversprechende Methoden, aber sie weisen dennoch Unterschiede im Vergleich zum menschlichen Auge auf. Speziesunterschiede führen bei organotypischen Modellen zu Über- oder Unterschätzungen von irritierenden Effekten. Zweidimensionale Zellkulturtests können nicht die natürliche Gewebearchitektur von dreidimensionalen Geweben nachbilden. Des Weiteren kann die harte und starre Oberfläche des Zellkulturplastiks den Metabolismus und die Funktion der Zellen verändern⁴⁶. Zweidimensionale Systeme sind darüber hinaus auf wasserlösliche Testsubstanzen beschränkt, wohingegen dreidimensionale Testsysteme die Testung von hydrophoben Flüssigkeiten und Feststoffen zulassen. Um die Nachteile der konventionellen zweidimensionalen Kultur zu überwinden, wurden große Anstrengungen unternommen, um dreidimensionale Cornea-Modelle mithilfe des Tissue Engineering zu entwickeln³⁹.

Mehrreihige Epithelien, wie das corneale Epithelium, sind durch einen mehrschichtigen Aufbau und eine daraus resultierende charakteristische Barriere-Funktion gekennzeichnet. In der Regel können deswegen dreidimensionale Gewebe mechanischen oder chemischen Schäden besser widerstehen als ein einschichtiger Zellrasen⁴⁷. In den frühen 80iger Jahren haben Bell et al. das erste rekonstruierte Hautäquivalent entwickelt. Seitdem ist bekannt, dass die Kultivierung von Gewebeäquivalenten an einer Luft-Flüssigkeitsphase zur Rekonstruktion von mehrschichtigen Epithelien mit ähnlichem anatomischen Aufbau wie das physiologische Gewebe beiträgt⁴⁸. Diese Gewebeäquivalente können sogar unter den richtigen Bedingungen die Barrierefunktion der Ursprungsgewebe nachstellen. Die Penetration von toxischen Substanzen wird durch diese Barriere limitiert und stellt somit eine essentielle Größe in der Bewertung von reizenden Chemikalien dar^{49,50}.

Das corneale Epithel ist die erste Barriere für Substanzen, die in die Augen kommen, was bedeutet, dass die Substanzen in direktem Kontakt mit dem Epithelium stehen. Rekonstruierte humane corneale Epithelien (RCE) konnten schon für Augenreizungstests, zellphysiologische Untersuchungen, Metabolismusanalysen, Entwicklung von Transportsystemen sowie Barriere- und Transportstudien eingesetzt werden^{49,51,52}.

In der Hauttoxikologie konnten bereits zwei in vitro-Testmethoden, basierend auf rekonstruierter humaner Epidermis, in zwei OECD-Testrichtlinien aufgenommen werden und damit der traditionell übliche Tierversuch komplett ersetzt werden^{53,54}. In diesen Richtlinien werden Viabilitätsmessungen zur Bestimmung von irritativen und korrosiven Effekten eingesetzt^{50,55,56}. Die Messung der Viabilität basiert auf der Annahme, dass alle Chemikalien, die zu schweren Irritationen führen, auch zytotoxisch für das Epithelium sind. Deshalb geht man davon aus, dass diese Analysemethode auch für die Vorhersage von Augenreizung in RCE-Modellen geeignet ist. Im Gegensatz zur humanen Epidermis besitzt das RCE keine verhornte Schicht und der Aufbau der Zellschichten unterscheidet sich^{57,58}.

Es werden verschiedene Modelle beschrieben, die sich hauptsächlich durch den zum Aufbau verwendeten Zelltyp unterscheiden. Corneale Modelle umfassen Modelle aus cornealen und nicht-cornealen Zellen wie zum Beispiel primäre humane Hautkeratinozyten (zum Beispiel EpiOcular™, MATtek Corporation, USA), primäre humane corneale Zellen (zum Beispiel LabCyte CORNEA-MODEL, Japan Tissue Engineering ca., Ltd., Japan; MCTT- human corneal epithelium (HCE) model) oder aus immortalisierten cornealen Epithelzellen (zum Beispiel SkinEthic™ HCE, EpiSkin, Frankreich, Vitrigel-HCE)^{59,60}.

Drei rekonstruierte corneale Epithelmodelle sind kommerziell erhältlich (EpiOcular™, SkinEthic™ HCE, LabCyte CORNEA-MODEL) und zwei davon sind 2008 in die Prävalidation als Augenreizungstest aufgenommen worden. Die Studie wurde zusammen von dem Referenzlabor der Europäischen Union für Alternativen zu Tierversuchen (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing ,EURL ECVAM) und Cosmetic Europe gesponsert, um ihre Eignung von EpiOcular™ und SkinEthic™ HCE als Testmethode zur Einschätzung des Augenreizungspotential international zu untermauern⁶¹.

Das EpiOcular™ ist ein nicht verhorntes Epithel aus untransformierten primären Hautkeratinozyten. Durch spezielle Kulturbedingungen evoziert, bauen die humanen Hautkeratinozyten ein dreidimensionales Modell, das das corneale Epithelium mit 5 - 8 Zellschichten und runden Zellen in der Basalschicht nachahmt. Das EpiOcular™ Augenreizungstestprotokoll unterscheidet zwischen Flüssigkeiten und Feststoffen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (für Flüssigkeiten 30 Minuten Substanzexposition, 2 Stunden Postexposition und für Feststoffe 90 Minuten Substanzexposition, 18 Stunden Postexposition). Eine Substanz wird als reizend eingestuft, wenn die mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) gemessene Viabilität des Modells 60 % oder weniger, bezogen auf die negative Kontrolle, beträgt. Bei Werten höher als 60 % werden die Testsubstanzen als nicht irritativ eingestuft. Der EpiOcular™ Augenreizungstest ist dazu gedacht, nicht irritierende Substanzen, die keine Kennzeichnung benötigen, von irritierenden Substanzen, die eine Kennzeichnung nach GHS-Kategorie 1 oder 2 benötigen, zu unterscheiden. Der Test ist jedoch nicht in der Lage, zwischen den GHS-Kategorien 1 und 2 zu differenzieren^{51,62}.

Das SkinEthic™ HCE Model ist ein standardisiertes Epithel aus einer immortalisierten humanen cornealen Zelllinie. Das rekonstruierte Epithel besitzt kein stratum corneum und ähnelt der Morphologie des cornealen Epithels. Das HCE-Model wurde schon verwendet, um corneale Regeneration in vitro, Laktatdehydrogenase Freigabe, Zytokinfreigabe und Genexpression zu analysieren. The SkinEthic™-Assay teilt Chemikalien mithilfe eines initialen Peptidreaktionstests in zwei Gruppen ein. In diesem Test wird die Testsubstanz mit Cystein- oder Lysin-haltigen Proteinen inkubiert und die nukleophile Reaktivität über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie evaluiert. Anhand des Testergebnisses

werden für reaktive Testsubstanzen eine kurze Inkubationszeit mit 10 Minuten und keine Postexposition gewählt. Für nicht reaktive Testsubstanzen beträgt die Inkubationszeit 60 Minuten mit 16 Stunden Postexposition. Die Viabilität wird mittels MTT-Test bestimmt. Nach dem Vorhersagemodell werden alle Chemikalien, die die relative Viabilität auf unter 50 % senken - bezogen auf die Kontrolle -, als augenreizende klassifiziert. Bei 50 % oder mehr Restviabilität geht man von nicht irritierenden Substanzen aus³⁶.

Das EpiOcular™ wurde durch das Referenzlabor der Europäischen Union für Alternativen zum Tierversuchen (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing, EURL ECVAM) evaluiert und in 2015 als OECD- Testrichtlinie 492 aufgenommen. Das SkinEthic™ HCE bedurfte jedoch noch umfassender Optimierungen, die außerhalb der gesponserten Studie stattfinden sollen⁶¹.

Die rekonstruierten cornealen Epithelien zur Klassifizierung von augenreizenden Substanzen von EpiSKin oder Mattek nutzen beide keine primären cornealen Epithelzellen. Diese Nutzung von Zelllinien und Zellen aus anderen Quellen oder Geweben kann zu einem veränderten Zellverhalten führen, wie zum Beispiel das Fehlen an zellspezifischen Markern⁶³. Allerdings werden neue Modelle mit humanen cornealen Epithelzellen entwickelt, insbesondere Labcyte CORNEA-MODEL und das MCTT-HCE Model, die die ersten kommerziell erhältlichen Modelle sind^{57,59,64}. Auch MatTek hat mit EpiCorneal ein dreidimensionales Modell aus primären cornealen Zellen entwickelt. Jedoch gibt es kein offiziell validiertes Cornea-Modell basierend auf primären humanen Cornea-Epithelzellen.

Das LabCyte CORNEA-MODEL wird aus primären cornealen Zellen aus menschlicher Cornea hergestellt. Auf einer synthetischen Membran kultiviert, zeigen die Zellen nicht nur eine ähnliche Morphologie, sondern auch die Expression cornea-spezifischer Marker⁶⁴. Zur Evaluierung des Modells als Testsystem für den Endpunkt Augenreizung wurde ein Protokoll ähnlich der OECD Testrichtlinie 492 eingesetzt. Unterschiede bestehen zwischen den Protokollen in der Expositionszeit (1 Minute für Flüssigkeiten und 24 Stunden Postexposition; Feststoffe 24 Stunden Exposition und keine Postexposition). Der Schwellenwert wurde bei 50 % festgelegt, vergleichbar zum SkinEthic-Protokoll⁵⁷. Obwohl die meisten etablierten RCE-Modelle synthetische Trägerstrukturen wie Polycarbonat verwenden, haben Takezawa und seine Mitarbeiter ein RCE-Modell speziell auf der Grundlage einer Kollagenmembran entwickelt. Die sogenannte Vitrigel-Membran besteht aus dicht gepackten Kollagenfibrillen, die durch Vitrifizierung hergestellt werden⁶⁵. Mit diesem Vitrigel-RCE-Modell wurde ein Augenreizungstest durchgeführt, bei dem der transepitheliale elektrische Widerstand (transepithelial electrical resistance, TEER) eingesetzt wurde, um eine Vorhersage über das Irritationspotential einer Substanz zu machen⁶⁰.

Alle beschriebenen Augenreizungstests zeigen eine Sensitivität und eine Spezifität zwischen 75-100 % und haben deshalb eine hohe Genauigkeit, um zwischen irritierenden nicht irritierenden Substanzen zu unterscheiden. Vitrigel-, LabCyte und EpiOcular™ konnten das Augenreizungspotential ohne eine falsch negative Prognose bestimmen (Sensitivität 100 %). Die Spezifität hingegen fiel mit geringeren Werten zwischen 75-80 % aus. Der SkinEthic™ Augenreizungstest erreichte eine Sensitivität von 85 %, aber zeigte weniger falsch positive Vorhersagen und damit eine höhere Spezifität als die anderen Tests. Nichtsdestotrotz ist keiner der Tests in der Lage, die GHS-Kategorie 1 von Kategorie 2-Substanzen zu unterscheiden.

Aus diesem Grund ist bis heute noch kein in vitro-Assay entwickelt und validiert worden, der den Draize-Augenreizungstest komplett ersetzt. Da es noch keinen kompletten Ersatz für den Draize-Augenreizungstest gibt, hat die EURL ECVAM in einem Expertentreffen (Februar 2005) eine gestaffelte Teststrategie („tiered approach“) vorgeschlagen, um die verschiedenen GHS-Kategorien für Augenreizung möglichst präzise vorherzusagen. Durch die Kombination der verschiedenen Augenreizungstests in einem Top-Down- oder Bottom-Up-Ansatz verspricht man sich, die Tierversuche zu reduzieren¹⁰.

Trotzdem fehlt der letzte Schritt den Draize-Augenreizungstest komplett zu ersetzen. Generell wird davon ausgegangen, dass der Schweregrad der Verletzung des Auges mit der Tiefe der Verwundung der Cornea korreliert¹⁰. Deshalb gilt die Annahme, dass ein Stroma zu dem Epithel benötigt wird, um zwischen Augen reizenden und schädigenden Substanzen in einem in vitro-Test zu unterscheiden. Die hier beschriebenen Modelle rekonstruieren jedoch nur das Epithelium. Die Entwicklung eines kompletten Cornea-Äquivalents aus Epithel, Stroma und Endothel ist daher erstrebenswert, um alle Schädigungen in die drei Kategorien für das Augenreizungspotential von Substanzen einordnen zu können und ohne sich der zeitaufwendigen und kostspieligen Arbeit einer gestaffelten Teststrategie unterwerfen zu müssen.

1.4.2 Komplexe Gewebemodelle

Zur Verbesserung der Vorhersagekraft und um einen autarken Test zu entwickeln, könnte mehr Komplexität als in den bestehenden Modellen nötig sein, um die Physiologie der Cornea widerzuspiegeln. Dies würde es ermöglichen, mehrere Ursachen für eine Augenirritation in einem Modell zu erfassen. Die Hauptbestandteile eines solchen Modells wären die verschiedenen Zelltypen und das hochorganisierte Stroma.

Hierfür sind komplexe Modelle entwickelt worden, die Epithel, Stroma und Endothel aus Zelllinien, primären tierischen Zellen oder primären humane Zellen kombinieren⁶⁶⁻⁶⁸. Modelle, die auf Zelllinien basieren, sind leicht zu handhaben und können in großen Mengen produziert werden. Eines der ersten Modelle, das immortalisierte Zellen aus Epithel, Stroma und Endothel für Risikoanalysen verwendet, wurde von Griffith et al. etabliert⁶⁶.

Die immortalisierten Zellen wurden aus cornealen Zellen hergestellt. Die generierten Zellen wurden nach der größten Übereinstimmung mit primären Zellen in Bezug auf Histologie und Elektrophysiologie ausgewählt. Zusätzlich wurden Chemikalien getestet, die ähnlichen Einfluss auf Transparenz und Zytotoxizität hatten, wie in menschlichen Corneas und denen der Kaninchen. Nichtsdestotrotz zeigen transformierte Zellen ein verändertes Bild durch eine ungehemmte Proliferation, Unterschiede in der Proteinexpression und der Genexpression, wie in dieser Studie hinreichend belegt wurde⁶⁶. Folglich sind Zelllinienbasierte-Modelle wahrscheinlich besser für initiale Untersuchungen in einer gestaffelten Teststrategie geeignet. In vitro-Modelle, basierend auf primären tierischen Zellen, haben den Vorteil, dass sie in großen Mengen aus Schlachtabfällen gewonnen werden können und dennoch die nativen physiologischen Eigenschaften aufweisen. Viele verschiedene Modelle wurden aus verschiedenen Spezies entwickelt. So wurden aus Kaninchen die drei Hauptzellen der Cornea kombiniert mit einer Fibrin-Agarose-Matrix. Das Gewebemodell zeigt Cornea-spezifische Marker wie Zytokeratin 3 und ultrastrukturelle Merkmale wie Tight junctions⁶⁷. Dennoch bleiben die Artunterschiede zwischen Tier und Mensch erhalten wie in diesem Fall, so dass das Kaninchenendothel hoch regenerative Eigenschaften im Gegensatz zum Menschen aufweist. Eines der am weitesten entwickelten Cornea-Äquivalente, wie Proulx et al. zeigen konnten, integriert humane Epithelzellen, stromale Zellen und Endothelzellen mit einer selbstproduzierten Fibroblastenmatrix⁶⁸. Das Modell wurde im Hinblick auf seine Expression von Transportproteinen wie der Natrium-Kalium Pumpe (Na⁺/K⁺ ATPase) und Adhäsionsproteinen wie Cadherinen untersucht⁶⁹. Aber auch hier weist das Modell noch Mängel auf, was die Transparenz und die geringe Dicke des Stromas im Vergleich zur nativen Cornea anbelangt. Des Weiteren fehlen noch Studien mit Testsubstanzen zur Bestimmung des Augenreizungspotentials mit diesem Modell.

Die Herstellung von Stroma-Äquivalenten stellt bis heute eine besondere wissenschaftliche Herausforderung dar, aufgrund der hohen ultrastrukturellen Ordnung und den daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften. Scott und Maurer haben die Wichtigkeit des Stromas für die Evaluierung des Augenirritationspotentials hervorgehoben, indem sie zeigten, dass die Regenerationsfähigkeit mit der Tiefe der Verletzung zusammenhängt^{8,10}. Verschiedene Ansätze von künstlichen Trägerstrukturen aus Polymeren, proteinbasierten oder biologischen Materialien wurden eingesetzt, um die biomechanischen Eigenschaften des kornealen Stromas zu ersetzen. Dem nativen Gewebe am ähnlichsten sind azellularisierte Cornea-Stromas. So konnte in 2008 azellularisierte porcine Cornea in Kaninchenaugen transplantiert werden⁷⁰. Diese Gewebe besitzen Potential für klinische Implantate. Von Nachteil ist dabei, dass man bei den Testungen wieder auf die Probleme der Speziesunterschiede stößt sowie eine teure Herstellung im Vergleich zu künstlichen Trägerstrukturen, die effizient in großen Mengen produziert werden können.

Zumeist wird hier Kollagen als Grundlage eingesetzt, da es im Stroma auch den Hauptbestandteil ausmacht. So wurde bovines Kollagen aus der Dermis eingesetzt, um Corneaepithel zu expandieren und die azelluläre Form als Implantat für Kaninchenaugen eingesetzt⁷¹. Um tierische Verunreinigungen zu umgehen und Chargenunterschiede zu vermeiden, kann rekombinantes humanes Kollagen eingesetzt werden^{66,72}. Die Kollagenhydrogele weisen jedoch noch Probleme bei der Stabilität, Zellkontraktion und Transparenz auf⁷³. Deshalb werden verschiedene Methoden untersucht, die mechanischen Eigenschaften zu verbessern, wie chemische Quervernetzung der Kollagenfibrillen, Vitrifizierung oder plastische Komprimierung⁷⁴⁻⁷⁶. Quervernetztes Kollagen konnte schon als Implantat im Menschen eingesetzt werden⁷². Andere Materialien wie das biokompatible Polycaprolacton werden ausprobiert, da sie bereits als Medizinprodukt zugelassen sind und in Haut und Knochen eingesetzt wurden. Erste Ergebnisse zeigen, dass konjunktivale Epithelzellen *in vitro* auf dem Polyester kultiviert werden können⁷⁷.

Eines der vielversprechenden Modelle für die Augenirritationstestung nutzt primäre humane corneale Epithelzellen, kultiviert auf einem Kollagenhydrogel mit stromalen Zellen. Erste Testungen des sogenannten Hemi-Cornea Modells zeigen die Möglichkeit, zwischen der augenreizenden GHS-Kategorie 2 und der augenschädigenden GHS-Kategorie 1 unterscheiden zu können^{78,79}. Andere Entwicklungen zielen darauf ab, weitere Zelltypen einzubeziehen wie zum Beispiel Immunzellen und Nervenzellen, die weitere Eigenschaften zur Homöostase des Gewebes beisteuern. Auch die Kommunikation zwischen den Zellen könnte einen wichtigen Beitrag zur Vorhersagekraft von augenreizenden Substanzen liefern, die Modelle mit nur wenigen Zelltypen nicht erkennen. So konnte in einem Cornea-Äquivalent mit Nervenzellen Gewebewachstum und die Kommunikation von Nervenzellen und dem Epithel über die Substanz P nachgewiesen werden⁸⁰. Die Schwierigkeit, die Komplexität der Cornea und ihrer Physiologie in Modelle umzusetzen, beweist, dass hier noch großes Potential für die Forschung und Entwicklung neuer Testmethoden und Implantate besteht.

1.5 Die Limitationen alternativer Testmethoden

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte gemacht, den Draize-Augenreizungstest durch alternative *ex vivo*- und *in vitro*-Methoden zu ersetzen^{28,34,43,81,82}. Insbesondere Testverfahren, die dreidimensionale Corneaepithel-Modelle verwenden, verfügen über das Potential, Tierversuche zu ersetzen, ohne selbst auf Tiermaterial angewiesen zu sein. Vergleichbar mit den rekonstruierten Hautmodellen, erreicht das EpiOcularTM-Testverfahren, das auf solch einem Modell basiert, wissenschaftlichen Standard und wurde in die OECD Richtlinien aufgenommen. Dennoch ist im Hinblick auf das Forschungsziel keine Testmethode zugelassen, die das ganze Spektrum der GHS-Kategorien für die Augenirritation abdeckt. Somit kann der Draize-Augenreizungstest bis heute nicht komplett durch

alternative Methoden ersetzt werden. Um dieses Problem zu überwinden, wurde eine gestaffelte Teststrategie vorgeschlagen, die verschiedene Methoden in einem Top-down oder Bottom-up Ansatz kombiniert. Dieser Methodenmix ist jedoch zeitaufwendig und kostspielig wegen der Vielzahl der Testmethoden, die durchgeführt werden müssen, und noch immer ist unklar, ob die Ergebnisse dann überhaupt wissenschaftlich ausreichend sind. Letztlich ist ein umfassender Test, der alle GHS-Kategorien in einem Verfahren differenzieren kann, das wissenschaftlich, ökonomisch und ethisch anzustrebende Ziel. Ob ein Cornea-Äquivalent als Modell dazu in der Lage ist oder auch weniger Komplexität ausreicht, soll im weiteren Verlauf dieser Dissertation geklärt werden.

Testmethoden bestehen jedoch nicht nur aus Modellen. Die Analyse ist das zweite Fundament in der Evaluierung der Toxikologie von Chemikalien. Der Draize-Augenreizungstest wird über 21 Tage evaluiert, um Kategorie 2-Substanzen zu erfassen. Dass die Zeit ein wichtiger Parameter ist, zeigt auch die retrospektive Analyse des Draize-Tests. 35 % aller Kategorie 1-Substanzen aus der verwendeten Datenbank wurden über die Persistenz der Effekte kategorisiert. Für Kategorie 1-Substanzen der neuen europäischen Chemikaliendatenbank ist dieser Wert sogar signifikant auf 65 % angestiegen¹⁸.

Nur der organotypische porcine Cornea Reversibilitäts Assay (Porcine Cornea Reversibility assay, PorCORA) weist eine Observationszeit von 21 Tagen auf. Der PorCora evaluiert das Zurückhalten von Fluoreszein durch das Epithel und konnte damit 28 von 32 Substanzen der GHS-Kategorie 1 und 2 korrekt identifizieren^{30,31}. Die meisten in vitro-Modelle können nicht über so einen langen Zeitraum kultiviert werden, da sie nur zu einem bestimmten Zeitpunkt die besten Eigenschaften vorweisen. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu überwinden, wäre in diesem Fall der Einsatz von Bioreaktoren, um die Kulturbedingungen weiter zu verbessern oder zum Beispiel einen Lidschlag im Modell zu ermöglichen^{83,84}. Ob die 21 Tag für vitro-Modelle benötigt werden, um das Augenreizungspotential korrekt vorherzusagen, bleibt dabei offen. Des Weiteren nutzen einige in vitro-Modelle, die in die OECD-Richtlinien aufgenommen wurden, final zerstörerische Methoden wie den MTT-Assay im EpiOcular™ -Test. Diese zerstörerischen Tests lassen keine wiederholte Messung der Modelle zu und somit auch keine Regenerations- oder Persistenz-Analyse, was ihren wissenschaftlichen Wert fragwürdig macht. Deswegen ist eine Methode ohne absichtlich herbeigeführte destruktive Analyse des Forschungsobjektes von besonderer Bedeutung für die Testmethode.

1.6 Impedanzspektroskopie zur Messung der Cornea

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wird in der Wissenschaft eingesetzt, um Epithelien und Endothelien zu untersuchen⁸⁵. Zellen bilden Zell-Zell-Kontakte wie zum Beispiel Tight junctions aus, um selektive Barrieren zu bilden und die Diffusion zu regulieren. Die Barrieren dienen der Homoöstate und der Kontrolle der Stofftransporte

im Gewebe. Mithilfe eines elektrischen Widerstands, der sich über die Epithelien und Endothelien bildet, können die Barriereigenschaften untersucht werden. Um Zellschäden durch Elektrolyse oder Erhitzung des Mediums zu verhindern, wird Wechselstrom eingesetzt. Der Widerstand im Wechselstrom ist abhängig von der Frequenz und kann als komplexe Zahl, die Impedanz, dargestellt werden. Ursprünglich wurde der TEER an einschichtigen Epithelien und Endothelien entwickelt und bei einer festen Frequenz von 12,5 Hz gemessen. Der Rest des Frequenzspektrums wurde größtenteils vernachlässigt. Im Gegensatz zur TEER-Messung macht sich die Impedanzspektroskopie einen größeren Frequenzbereich von 1 Hz - 100 kHz zunutze. Dadurch erhält man mehr Informationen über die Barriereigenschaften⁸⁵. Zusätzlich ermöglicht die Spektroskopie die Erstellung eines mathematischen Ersatzschaltbildes, bei dem die verschiedenen Anteile der komplexen Barriere berücksichtigt werden können. Die Methode ist darüber hinaus nicht destruktiv, da die Stromstärke weniger als 3 mA beträgt. Das ermöglicht die wiederholte zerstörungsfreie Messung des Gewebes und erlaubt somit Regenerationsprozesse über einen längeren Zeitraum zu erforschen (Abbildung 5).

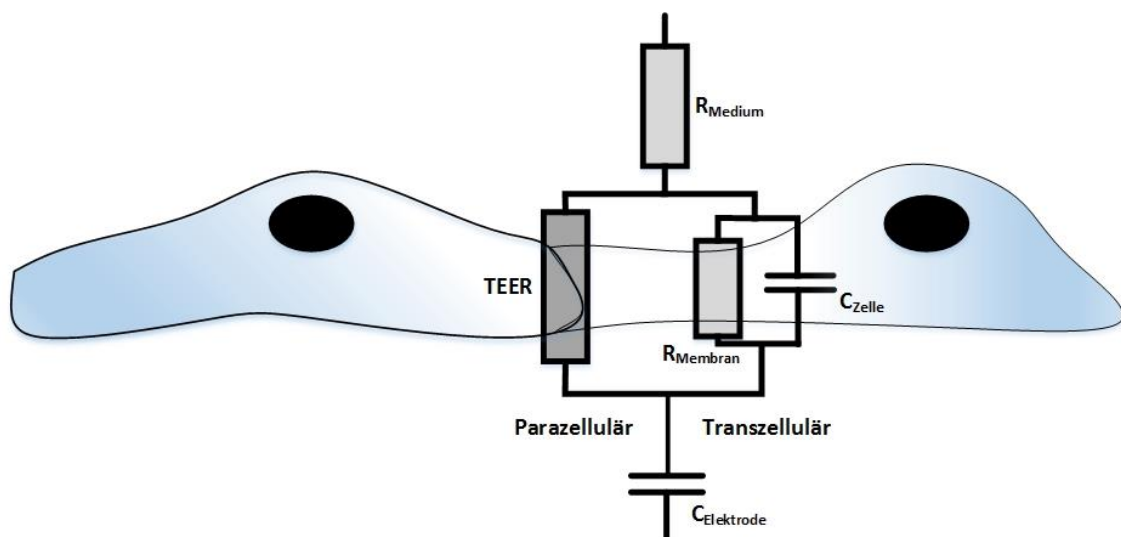


Abbildung 5: In vitro-Impedanzspektroskopie. Ersatzschaltbild, das den trans- und parazellulären Stromfluss darstellt. Widerstand des Mediums (R_{Medium}), Transepithelärer elektrischer Widerstand (TEER), Kapazität der Elektroden ($C_{\text{Elektrode}}$), Kapazität der Zellen (C_{Zelle}) und Widerstand der Zellmembran (R_{Membran}). Bei den meisten Epithelien korreliert der transzelluläre Stromfluss mit dem TEER-Wert.

Trotz dieser Fortschritte ist bisher immer noch keine allumfassende in vitro-Methode validiert, die alle drei GHS-Kategorien für Augenirritation erkennt und richtig zuordnet. Auch wenn die gestaffelte Teststrategie Tierversuche reduziert, sind die Komplexität der Durchführung und die sich dabei potenzierenden Kosten unattraktiv für die industrielle Anwendung. Selbst die EURL-ECVAM erwartet: " ... dass in absehbarer Zeit kein einziger in vitro-Augenreizungstest den in vivo-Draize-Augentest ersetzen kann, um den gesamten Bereich der Irritation für verschiedene chemische Klassen vorherzusagen".

2 Zielsetzung

Eine differenzierte Risikoanalyse von Chemikalien über deren Potential das menschliche Auge zu schädigen ist unabdingbar für die öffentliche Gesundheit, weshalb alle neuen Substanzen in standardisierten toxikologischen Testverfahren evaluiert werden müssen. Hierfür sollen die ursprünglichen Tierversuche aufgrund wissenschaftlicher, wirtschaftlicher und ethischer Gründe durch alternative Methoden ersetzt werden. Es existieren bereits erste alternative ex vivo- und in vitro-Testsysteme für den toxikologischen Endpunkt Augenreizung. Jedoch gibt es bisher kein alleinstehendes Testverfahren, das in der Lage wäre, das ganze Spektrum der drei GHS-Kategorien für Augenirritation zu erkennen. Die validierten Testverfahren können nicht zwischen Substanzen unterscheiden die schwere Augenschäden (GHS-Kategorie 1) oder eine Augenreizung (GHS-Kategorie 2) verursachen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die verwendeten in vitro-Modelle nur das corneale Epithelium nachbilden und aus cornea-fremden (beispielsweise Hautzellen) Zellen generiert werden. Zum anderen verwenden die Testverfahren destruktive Analyseverfahren wie den MTT-Test, die in ihrer Sensitivität beschränkt sind und keine Aussage über die Persistenz einer Irritation zulassen.

Die vorliegende biomedizinische Dissertation beabsichtigt deshalb auf Grundlage des Tissue Engineerings, alle GHS-Kategorien in Bezug auf die Augenirritation in einem alleinstehenden in vitro-Testsystem zu erkennen und einzuordnen.

Dafür sollen in dieser Forschungsarbeit zwei Strategien verfolgt werden. Erstens soll systematisch untersucht werden, ob sich die Prädiktivität der bisherigen Testverfahren durch den Einsatz verbesserter Modelle aus primären humanen cornealen Epithelzellen und aus primären human epidermalen Epithelzellen erhöhen lässt. Die Hypothese dahinter ist, dass ein Modell mit ähnlicher Anatomie und ähnlichem molekularem Muster wie das natürliche Gewebe in gleicher Weise mit den Chemikalien reagiert. Darüber hinaus sollen die Modelle durch ein Stroma-Äquivalent erweitert werden, um die Tiefe der Verletzung des Auges mit einbeziehen zu können.

Zweitens soll evaluiert werden in wieweit sich die Impedanzspektroskopie als zerstörungsfreie Messmethode eignet, zum einen den Gewebezustand genauer als über kolorimetrische Tests zu erfassen und zum anderen, um die Persistenz von Schädigungen beziehungsweise Regenerationsprozesse im Modell zu untersuchen. Zur Identifizierung von Schlüsselereignissen soll dabei ein mathematischer Algorithmus oder eine passende Frequenz gefunden werden.

Beide Strategien sollen dann auf ihre Eignung zur Implementierung in ein verbessertes Testverfahren zur Erkennung der Augenreizung gegeneinander geprüft werden, wobei dann die vielversprechendere Herangehensweise an einem Panel an irritativen und nicht-irritativen Substanzen validiert werden soll.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Ausstattung

Tabelle 3: Liste der Ausstattung

Ausstattung/ Gerät /Software	Hersteller
Absaugvorrichtung: VacuBoy	Integra Biosciences, Fernwald (GER)
Abzug	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfl (AUT)
Analysewaage	Kern, Balingen-Frommern (GER)
Autoclav: „Tecnoclav“	Biomedis, Giessen (GER)
Table-top Autoclav: „Varioklav“	Systec, Wettengel (GER)
Block-Station	Leica, Wetzlar (GER)
Brutschrank: 37 °C, 5% CO ₂	Heraeus, Hanau (GER)
Dampfgarer: „MultiGourmet“	Braun, Kronberg/Taunus (GER)
Digitalkamera	Canon, Krefeld (GER)
Durchflusszytometer: FACSCalibur	BD, Heidelberg (GER)
Einbettmaschine	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (GER)
Einhängethermostat für Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen (GER)
Eismaschine: „AF-80“	Scotsman, Mailand (ITA)
Flüssigstickstofftank: MVE 815 P-190 (-180 °C)	German-cryo, Jüchen (GER)
Gefrierbehälter: Mr. Frosty	VWR, Darmstadt (GER)
GraphPad PRISM	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Hand-Stückzähler	NeoLab, Heidelberg (GER)
Heißluft-Sterilisator	Memmert, Schwabach (GER)
Impedanzmessgerät: LCR HiTESTER 3522-50	HIOKI E.E. Corporation, Nagano (JPN)
Inkubator	Medite, Burgdorf (GER)
Kühlraum, 4°C	Genheimer, Höchberg (GER)
Kühlschränke:	
-80°C	Thermo Scientific, Waltham (USA)
-20°C	Liebherr, Biberach a.d. Riss (GER)
LabVIEW	National Instruments, Austin TX (USA)
Magnetrührer mit integrierter Heizung: Type 720-HPS	VWR, Darmstadt (GER)
Microplate Reader: Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim (GER)
Mikroskope: Axiovert 40C , AxioVision Observer.D1, LEO TEM AB912	Zeiss, Göttingen (GER)

Ausstattung/ Gerät /Software	Hersteller
Biorevo BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg (GER)
Multi-Channel-Pipette Plus	Eppendorf, Hamburg (GER)
Multistep-Pipette	Brand, Wertheim (GER)
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg (GER)
Gewebebad: Type 1052	Medax, Kiel (GER)
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen (GER)
Pipetten: 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf, Hamburg (GER)
Pipettenstopfmaschine	BellCo Glass Dunn, Asbach (GER)
Pipettierhilfe: Pipet Boy	Brand, Wertheim (GER)
Pumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld (GER)
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach (GER)
Schaukelplattformschüttler	NeoLab, Heidelberg (GER)
Schlittenmikrotom RM 2255	Leica, Wetzlar (GER)
Septophag	Hesse, Emmerich (GER)
Sicherheitswerkbank 2020	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (GER)
Spinnerflasche	Corning, Wiesbaden (GER)
Spülmaschine	Miele, Gütersloh (GER)
Stromversorgung: EV202, EV243	PeqLab Biotechnology, Erlangen (GER)
testXpert II Software	Zwick GmbH & Co KG, Ulm (GER)
Timer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (GER)
Trockenschrank	Memmert, Schwabach (GER)
Vortexer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (GER)
Wägezelle Zwick/Roell Z005	Zwick GmbH & Co KG, Ulm (GER)
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach (GER)
Zentrifugen:	
Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (GER)
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (GER)
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg (GER)

3.1.2 Einwegartikel

Tabelle 4: Liste der Einwegartikel

Einwegartikel	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (GER)
Combitips Plus: 0.5 ml, 1 ml, 2.5 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg (GER)
Deckgläschen: 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig (GER)
Einbettkassetten	Klinipath, Duiven (NED)

Einwegartikel	Hersteller
Einweg-Pipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Entsorgungsbeutel	Hartenstein, Würzburg (GER)
Fettstift	Dako, Hamburg (GER)
Filterpapier	Labonord, Mönchengladbach (GER)
Handschuhe:	
Latex	Cardinal Health, Kleve (GER)
Nitrile	Kimberly-Clark, Koblenz (GER)
Kryoröhrchen: 1.8 ml	Nunc, Wiesbaden (GER)
Mikrotomklingen: Type A35	pfm Medical, Köln (GER)
Multititerplatte-Platten: 6 well, 12 well, 24 well, 96 well	TPP, Trasadingen (GER)
Objektträger:	
unbeschichtet (26 x76 x1 mm)	Menzel, Braunschweig (GER)
Polysine™ (25 x75 x1 mm)	Langenbrinck, Emmendingen (GER)
Parafilm®	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim (GER)
Pipettenspitzen: 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf, Hamburg (GER)
Reaktionsgefäße: 1.5 ml, 2.0 ml	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Septophag Entsorgungsbeutel	Porod, Frauenhofen (AUT)
Skalpellklingen, rund	Bayha, Tuttlingen (GER)
Spritzen: 5 ml, 10 ml, 20 ml	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
Sterilfilter für Spritzen: Durchmesser 50 mm, Porengröße 0.2 µm	Sartorius Stedium Biotech, Göttingen (GER)
Sub D Stecker	Conec, Lippstadt (GER)
Waagschale	Hartenstein, Würzburg (GER)
Zellkulturflaschen: 25cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturschalen: 145 x20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)

3.1.3 Labormaterial

Tabelle 5: Liste des Labormaterials

Labormaterial	Hersteller
Becher: 1 L, 250 ml	Schott, Mainz (GER)
Cytotoxicity Detection Kit PLUS	Roche, Grenzach-Wyhlen (GER)
Edelstahlgussformen zum Einbetten von Gewebe: 24 x 37 x 9 mm	Labonord, Mönchenglattbach (GER)
Glaspipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Brand, Wertheim (GER)
Kälteschutzhandschuhe	VWR, Darmstadt (GER)
Laborflasche: 1 L, 250 ml, 100 ml, 50 ml	Schott, Mainz (GER)
Löffelspatel	Hartenstein, Würzburg (GER)
Magnetrührstab	Hartenstein, Würzburg (GER)
Magnetrührstäbchen-Angel	Hartenstein, Würzburg (GER)
Messkolben mit Stopfen: 1 L, 2 L	Schott, Mainz (GER)
Objektträgerregale: Glass, Stainless Steel	Mercateo, Munich (GER)
Pinzette	Assistent, Sondheim (GER)
Reaktionsgefäßbeständer	NeoLab, Heidelberg (GER)
Schutzbrille	NeoLab, Heidelberg (GER)
Skalpell	Bayha, Tuttlingen (GER)
Spatel	VWR, Darmstadt (GER)
Sprühflasche	Hartenstein, Würzburg (GER)
Sterilfilter (Aufsatz für Laborflaschen)	Hartenstein, Würzburg (GER)
Trichter	Hartenstein, Würzburg (GER)
Zentrifugenröhrchenständer	NeoLab, Heidelberg (GER)

3.1.4 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 6: Liste der Chemikalien und Lösungen

Chemikalie/ Lösung	Hersteller
1,4- Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-	Sigma-Aldrich, München (GER)

Chemikalie/ Lösung	Hersteller
ethansulfonsäure (Hepes)	
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Serva, Heidelberg (GER)
4-arm Polyethylenglykol-succinimidylglutaratester (10000 MW)	JenKem, Plano (USA)
Accutase	ThermoFisher, Waltham (USA)
Aceton ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Albumin-Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat (Alaun)	VWR, Darmstadt (GER)
Ascorbinphosphat	Sigma-Aldrich, München (GER)
Benzalkoniumchlorid	Sigma-Aldrich, München (GER)
Calciumchlorid (CaCl_2)	VWR, Darmstadt (GER)
Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich, München (GER)
Corneal Epithelial Cell Growth Kit	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas (USA)
Corneal Epithelial Cell Basal Medium	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas (USA)
Citronensäure (Citrat)	VWR, Darmstadt (GER)
DAPI Fluoromout-G TM	Southern Biotech, Birmingham (USA)
Demineralisiertes Wasser	Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg (GER)
Descosept	Dr. Schumacher, Malsfeld (GER)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Dispase-Pulver	ThermoFisher, Waltham (USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Darmstadt (GER)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS ⁻ :without MgCl_2 and NaCl_2 , PBS ⁺ :with MgCl_2 and NaCl_2)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Eindeckmedium: Entellan	Merck, Darmstadt (GER)
Eindeckmedium: Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Eosin	Sigma-Aldrich, München (GER)
Epilife	ThermoFisher, Waltham (USA)

Chemikalie/ Lösung	Hersteller
Esel-Serum	Sigma-Aldrich, München (GER)
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Ethanol, vergällt (96%)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Fibroblast Medium	ScienCell, Carlsbad (USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Fötale Kälberserum	Lonza, Cologne (GER)
Glycerol (86 %)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Glycine	AppliChem, Darmstadt (GER)
Hämatoxylin nach Meyer	Morphisto, Frankfurt (GER)
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	ThermoFisher, Waltham (USA)
Hydrochloric acid (HCl; 37%, 1M)	VWR, Darmstadt (GER)
Imidazol	AppliChem, Darmstadt (GER)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (GER)
Kaliumtetrafluoroborat	Sigma-Aldrich, München (GER)
Keratinocyte growth factor (KGF)	ThermoFisher, Waltham (USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	BioRad, Munich (GER)
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Invitrogen, Darmstadt (GER)
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Penicillin / Streptomycin (100x concentrated)	PAA, Cölbe (GER)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-)	Invitrogen, Darmstadt (GER)
Reinstwasser	Millipore, Schwalbach (GER)
Roti-Histofix 4 % (Formaldehyd)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Triton-X 100	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Trizma® Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München (GER)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München (GER)
Tween-20	VWR, Darmstadt (GER)

Chemikalie/ Lösung	Hersteller
Vasculife	ThermoFisher, Waltham (USA)
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe (GER)

3.1.5 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 7: Liste der Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medium/ Lösung	Zusammensetzung
0,05 % Trypsin/EDTA	10 % 0,5 % Trypsin-EDTA-Lösung in PBS-/EDTA Solution
Ascorbinphosphat-Lösung	73 mg/ ml Ascorbinphosphat in E1-Medium, sterilfiltriert
Calciumchlorid-Lösung	44 mg/ ml Calciumchlorid in PBS-, sterilfiltriert
Kollagenase-Lösung	500 U/ ml Kollagenase in DMEM
Dispase-Lösung (2 U/ ml)	2 U/ ml Dispase Pulver in PBS-
E1-Medium	1 % Penicillin / Streptomycin 1 % HKGS in EpiLife
E2-Medium	0,48 % Calciumchlorid-Lösung in E1-Medium
E3-Medium	0,1 % Ascorbinphosphat-Lösung 0,1 % KGF-Lösung in E2-Medium
KGF-Lösung	10 µg/ ml KGF in EpiLife
Mowiol-DAPI Eindeckmedium	0,1 % DAPI in Mowiol
MTT-Lösung	1 mg/ ml MTT in PBS-
PBS-/EDTA Lösung	0,0002 % EDTA in PBS-

Medium/ Lösung	Zusammensetzung
	pH: 7.2 autoklaviert

3.1.6 Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie

Tabelle 8: Liste der Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie

Chemikalie/ Lösung	Zusammensetzung
Antikörperverdünnungslösung	5 % BSA 5 % Esel-Serum 0.3 % Triton in PBS
Gelneutralisationlösung	0,03 % HEPES 3 M 0,05 % Chondroitinsulfat 0,03 % FCS pH 8,5 in DMEM x2
TBST, 0.05 M	10 %l TBS Stock 0.5 M 0,5 % Tween-20 in demineralisiertem Wasser
Tris gepufferte Lösung (TBS) Stock, 0.5 M (10x konzentriert)	78,8 g/l Tris 87,66 g/l NaCl in Reinstwasser pH 7.6 Autoklaviert

3.1.7 Antikörper

Tabelle 9: Antikörperliste

Antikörper	Wirt	Konzentration	Hersteller
Alexa Fluor 555, Anti-Kaninchen	Esel	5 µg/ ml	ThermoFisher, Waltham (USA)
Alexa Fluor 555, Anti-Maus	Esel	5 µg/ ml	ThermoFisher, Waltham (USA)
Zytokeratin 1	Kaninchen	0,5 µg/ ml	Abcam, Cambridge (UK)

Antikörper	Wirt	Konzentration	Hersteller
Zytokeratin 14	Kaninchen	1 µg/ ml	Sigma-Aldrich, München (GER)
Zytokeratin 3 /12	Maus	1 µg/ ml	Bioss, Woburn (USA)
Involucrin	Kaninchen	1 µg/ ml	ThermoFisher, Waltham (USA)
Loricrin	Kaninchen	2 µg/ ml	Abcam, Cambridge (UK)

3.1.8 Biologisches Material und humanes Spendermaterial

Humane Corneas wurden aus Corneas, die die Qualitätskontrolle für Transplantationen nicht bestanden haben, mit Einwilligung des Patienten und der Zustimmung des lokalen Ethikkomitees (Zulassungsnummer 182/20) isoliert.

Humane epidermale Keratinozyten stammen aus Vorhautbiopsien von 2-5 Jahre alten Spendern. Ihre Isolierung fand statt mit der Einwilligung der Erziehungsberechtigten und der Zustimmung des lokalen Ethikkomitees (Zulassungsnummer IGBZSF-2012-078).

Für die Generation von Cornea-Äquivalenten wurde die retinale Pigmentepithelzelllinie von Dr. Kampik aus der Augenklinik Würzburg bereitgestellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Kollagenisolation aus Rattenschwänzen

Das Kollagen wurde aus Rattenschwänzen von 8-10 Wochen alten Tieren isoliert. Die Desinfektion der Rattenschwänze mit 70 % Ethanol dauerte 5 Minuten. Die Haut der Rattenschwänze wurde zu zwei Drittel aufgeschnitten und mit einer Pinzette abgezogen. Nach einem Waschschrift mit PBS⁻ wurde der Schwanz gebrochen und die Sehnen von der Schwanzspitze her hinausgezogen. Die so gewonnenen Sehnen wurden gesammelt und der Prozess mit ca. 100 Schwänzen für eine Isolation wiederholt. Die folgende Entfernung von Fett, Bindegewebe und Blutgefäßen an den Sehnen und die anschließende 3-malige Waschung mit PBS⁻ ging der Lagerung der Schwänze bei -80°C voraus. Die weitere Verarbeitung bestand aus der 10-minütigen Inkubation der Sehnen in 70% Ethanol, der 3-maligen PBS⁻ Waschung und der weiteren Zerkleinerung der Sehnen. Danach erfolgte die Überführung und Trocknung der Sehnenstücke in einen Bottle-Top-Filter. Das getrocknete Kollagen wurde gewogen und 24 ml pro g 0,1 % Essigsäure zugegeben um, eine Konzentration von annähernd 10 mg/ml zu erhalten. Um das Kollagen zu lösen, wurde das Gemisch in einer Spinnerflasche für 17 Tage bei 4°C gerührt. Der Entfernung von Verunreinigungen diente die 1-stündige Zentrifugation der Kollagenlösung bei 10 g. Der Überstand wurde in 50 ml Aliquote überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.2 Zellkulturmethoden

Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Zellkulturmaterialien waren steril oder wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren entkeimt. Die Zellen und Modelle wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.2.1 Zellkultur der RPE-Zelllinie

RPE-Zellen wurden in T-150 Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS kultiviert. Die Aussaatdichte betrug 5000 Zellen/ cm².

3.2.2.2 Isolation und Zellkultur von epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten

Die Durchführung der Isolation erfolgte wie zuvor beschrieben⁸⁶. Die Biopsien wurden gewaschen, klein geschnitten und mit 2 U/ml Dispase verdaut, um die Epidermis von der Dermis zu trennen. Anschließend wurde die Epidermis mit Trypsin-Lösung und die Dermis mit 500 U/ml Kollagenase verdaut, um eine Einzellösung zu schaffen. Die Kultivierung epidermalen Epithelzellen fand in Epilife® und die der dermalen Fibroblasten in DMEM mit 10 % FCS statt.

3.2.2.3 Isolation und Zellkultur cornealer Zellen

Humane Corneas dienen der Isolation der Epithel-, Stroma- und Endothelzellen. Das Verfahren begann mit der Überführung des Gewebes in eine Petrischale mit 10 ml PBS⁺. Zur Isolation der Endothelzellen wurde eine Spritze mit gebogener Nadel parazentral der Cornea parallel zur Descemet-Membran eingeführt. Das Einspritzen von Luft bewirkte eine Blase zwischen Stroma und Membran. Die Decemet-Membran konnte für die weitere Aufbereitung ausgeschnitten werden. Anschließend wurde die Cornea horizontal in 2-3 mm große Stücke geschnitten und in einer Petrischale mit 10 ml Dispase [2 U/ml] für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Das Epithel wurde mit einer Pinzette von der zentralen Cornea in Richtung Limbus abgezogen und in eine neue Petrischale mit 10 ml PBS⁺ übertragen. Vom restlichen Gewebe wurde der Limbus entfernt und die stromalen Anteile in einer Petrischale mit 10 ml PBS⁺ gesammelt. Die Epithelstücke wurden bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und durch Auf- und Abpipettieren vor dem Aussäen zerkleinert. Die Stromastücke wurden in Kollagenase [500 U/ml] für 45 Minuten bei 37°C angedaut. Zum Auswachsen der Zellen wurden die Stücke in eine T-75 Flasche mit 5 ml Medium ausgesät (Abbildung 6). Die Kultivierung der cornealen Epithelzellen fand in Corneal Epithelium Medium supplementiert mit Corneal Epithelial Cell Growth Kit, die der stromalen Zellen in Fibroblast Medium und die der Endothelzellen in Vasculife® statt.

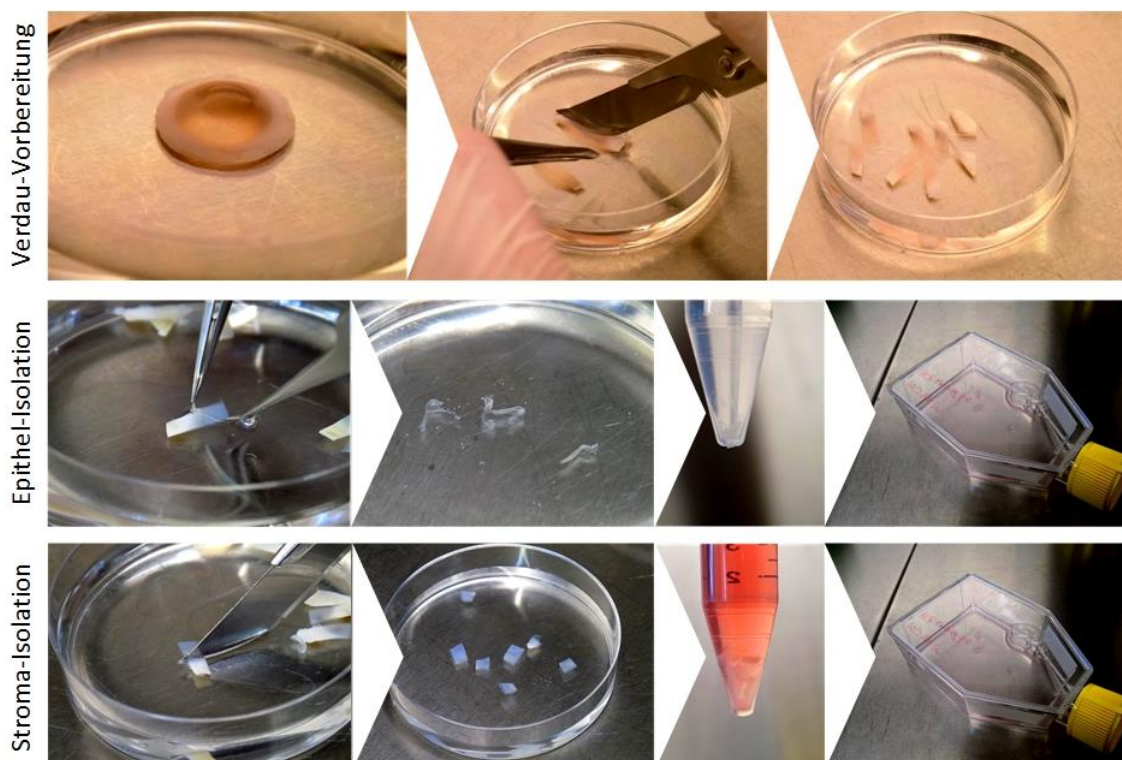


Abbildung 6: Isolation und Präparation der cornealen Zellen. Verdau-Vorbereitung: Waschen der Cornea in PBS und anschließende Zerkleinerung in längliche Streifen für den Dispase-Verdau. Epithel-Isolation: Abziehen des Cornea-Epithels von zentral nach lateral, Zentrifugation der Epithelstücke und die Aussaat in einer T-25 Zellkulturflasche. Stroma-Isolation: Abschneiden des limbalen Rings, Kollagenase-Verdau, Zentrifugation der Stroma-Stücke und die Aussaat in einer T-75 Zellkulturflasche.

3.2.2.4 Zellpassage

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-90 % passagiert. Um die Epithelzellen abzulösen, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und mit Acutase® für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die 3-minütige Inkubation der Zellen mit Trypsin diente der Ablösung von stromalen und dermalen Fibroblasten. Die Zellen wurden mit frischem Medium resuspendiert und in einem 50 ml Röhrchen bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in seinem entsprechenden Medium wieder aufgenommen. Die Zählung der Zellen und ihre Aussaat mit 3000-5000 Zellen/cm² schlossen die Zellpassage ab. Alle primären Zellen kamen maximal für 3 Passagen in den Experimenten zur Verwendung.

3.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Ermittlung der Zellzahlen und ihrer Vitalität geschah mittels der Trypanblau-Färbung. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt und 10 µl auf eine Neubauer-Zellkammer aufgetragen. Die Auszählung der Zellen in den vier großen Quadranten gelang mithilfe des Mikroskops, wobei die transparenten lebenden Zellen von toten blauen durch die Trypanblau-Färbung unterschieden werden konnten. Aufgrund des spezifischen Volumens und der gezählten lebenden Zellen wurde die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$M_{LC} * 10^4 * 2 * V_{CS} = \text{Lebende Zellen/ml}$$

V_{CS} - Volumen der Zell-Lösung

M_{LC} - Mittelwert der lebenden Zellen pro Quadrant

Die Zellvitalität konnte als Quotient der lebenden Zellen und der Gesamtanzahl der Zellen errechnet werden.

3.2.2.6 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit

Die Wachstumsgeschwindigkeit der cornealen Zellen wurde bestimmt, indem $1 * 10^5$ Zellen/ Well in einer 6-Well-Multititerplatte drei Tage kultiviert worden sind. Nach 3 Tagen wurden die Zellen gezählt und wieder mit $1 * 10^5$ Zellen/ Well bis zur dritten Passage ausgesät. Die Wachstumsgeschwindigkeit pro Stunde wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$GR = \text{Log}_{10}(M_{LC} / 10^5) / (3 * 24)$$

GR = Wachstumsgeschwindigkeit

M_{LC} = Mittelwert der lebenden Zellen pro Quadrant

3.2.2.7 Kryokonservierung der Zellen

Die Aufbewahrung der Zellen fand bei -80°C für kurze Zeit und für längere Zeit bei -180°C in flüssigen Stickstoff statt. Vor dem Einfrieren der Zellen in einer Konzentration von $1-3 \cdot 10^6$ Zellen/ml erfolgte die Ablösung und Zellzählung. Als Einfriermedium diente das entsprechende Kulturmedium unter Beimischung von 10 % DMSO. Das Einfrieren der Zellen in den Kryoröhrchen in Einfrierbehältern dauerte 24 Stunden mit -1 K/min bei -80°C . Zur Reaktivierung der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C angetaut und sodann mit vorgewärmten Medium gemischt und in 10 ml des entsprechenden Zellmediums überführt, bei 300 g für 3 Minuten zentrifugiert und schließlich der Überstand verworfen. Die Resuspendierung und weitere Kultivierung der Zellen fand im entsprechenden Zellkulturmedium statt.

3.2.2.8 Herstellung der in vitro-Cornea- und Hautmodelle

Der Aufbau der rekonstruierten humanen Epidermis (RHE) erfolgte wie zuvor beschrieben⁸⁷. Die humanen epidermalen Keratinozyten wurden auf Polycarbonat-Membranen ($0,4 \mu\text{m}$ Porengröße) mit 5000 Zellen/ cm^2 in 150 μl in Epilife® supplementiert mit 1,5 mM CaCl_2 und HKGS. Im Wechsel kam nach 24 Stunden das Epilife® Luft-Flüssig-Phase-Medium zum Einsatz, das zusätzlich 73 $\mu\text{g/ml}$ L-Ascorbinsäure-2-phosphat und 10 ng/ml Keratinozyten-Wachstumsfaktor enthält, wenn nicht anders angezeigt. Der Zeitraum für die Kultivierung des RHE-Modells umfasste 21 Tage. Um das modifizierte, rekonstruierte humane Epidermis-Modell (mRHE) herzustellen, wurde die Kulturzeit auf 11 Tage reduziert. Für die Herstellung des rekonstruierten humanen Cornea-Epitheliums (RCE) in 11 Tagen galt dasselbe Protokoll mit 2500 Zellen/ cm^2 humanen cornealen Zellen.

3.2.2.9 Abschätzung des molaren Verhältnisses von primären Aminen des Kollagens und des N-Hydroxysuccinimid-Esters und des vierarmigen Polyethylenglykolsuccinimidylglutaratester (PEG-SG)

Die Quervernetzung basierte auf der Reaktion der primären Amine des Kollagens und des N-Hydroxysuccinimid-Esters des PEG-SG. Um das Kollagen quer zu vernetzen, musste die korrespondierende Menge an PEG-SG berechnet werden. Lysine in der primären Aminosäuresequenz des Kollagens und die N-Termini stellten die primären Amine. Deswegen wurde die Menge an Lysinen im Rattenschwanz-Kollagen Typ I definiert. Die Bestimmung der Anzahl der Lysine im Rattenschwanz-Kollagen Typ I fand mittels der Datenbank <http://www.uniprot.org> (Universal Protein Resource) statt. Rattenskollagen vom Typ I besteht aus zwei $\alpha 1$ -Ketten (CO1A1_RAT; P02454) und einer $\alpha 2$ -Kette (CO1A2_RAT; P02466). Das Prä-Pro-Peptid der $\alpha 1$ -Kette besteht wiederum aus 1.453 Aminosäuren und 1.057 Aminosäuren nach der posttranslationalen Verarbeitung, von denen 38 Lysine sind. Das resultierende molekulare Gewicht der $\alpha 1$ -Kette beträgt somit

95.016 g/ mol. Das Prä-Pro-Peptid der $\alpha 2$ -Kette setzt sich laut Datenbank aus 1.372 Aminosäuren zusammen, von denen 1.041 Aminosäuren mit 32 Lysinen und einem molekularen Gewicht von 93.607 g/ mol nach posttranslationaler Prozessierung übrigbleiben. Zusammengenommen ergibt dies das molekulare Gewicht eines Kollagenmoleküls von 283.639 g/ mol mit 108 Lysinen und 3 N-termini. In einem Gramm Kollagen sind $3,526 * 10^{-6}$ mol Kollagen. Folglich beinhaltet das Kollagen 111 NH_2 (108 Lysine und 3 N-Termini) oder $3,913 * 10^{-4}$ mol freier Amine. Demnach entspricht 1 mg Kollagen $3,913 * 10^{-7}$ mol. Ein PEG-SG Molekül kann theoretisch mit vier Aminen reagieren. PEG-SG hat eine molekulare Masse von 10.000 g/ mol. Um also theoretisch eine Quervernetzung von 100 % der freien Amine in einem 1 mg zu erreichen, muss 1 mg PEG-SG eingesetzt werden.

3.2.2.10 Kollagen-Quervernetzung mit PEG-SG und die Generierung von stromalen und dermalen Äquivalenten

Um quervernetzte Kollagenhydrogele herzustellen, wurde Rattenschwanzkollagen Typ I 6 mg/ ml in 0,1 % Essigsäure mit Gelneutralisationslösung (75 mM HEPES, 48 mM Glucose) 1:1 gemischt. Zum Quervernetzen wurden zwei verschiedene Konzentrationen von PEG-SG zur Gelneutralisationslösung hinzugefügt. Hierfür wurde die gewünschte Menge PEG-SG in eiskalter Gelneutralisationslösung gelöst und 30 Sekunden lang mit Kollagen gemischt. Die Berechnung der Menge an PEG-SG geschah anhand des molaren Verhältnisses der primären Amine im Kollagen und des N-Hydroxysuccinimid-Esters des PEG-SG. Deshalb wurde 1 mg Kollagen mit 0,5 mg oder 1 mg PEG-SG gemischt, um eine theoretische Quervernetzung von 50 % oder 100 % aller freien Amine zu erreichen. Nachfolgend wird die Konzentration, die theoretisch ausreicht, um 50 % der primären Amine quervernetzt als PEG-SG₅₀ zu bezeichnen und die PEG-SG Konzentration, die theoretisch alle primären Amine vernetzt, PEG-SG₁₀₀ genannt. Nach dem Mischen der Gelneutralisationslösung mit PEG-SG und der Kollagen Typ I-Lösung wurden die Hydrogele für 15 Minuten bei 37°C geliert. Zur Herstellung von stromalen oder dermalen Äquivalenten wurden $1 * 10^5$ Zellen/ ml humaner stromaler oder dermalen Fibroblasten in der zweiten Passage zur Gelneutralisationslösung hinzugefügt. Ein Schema der Quervernetzungsreaktion ist in Abbildung 13A dargestellt. Nicht quervernetzte Hydrogele wurden nach demselben Verfahren hergestellt ohne die Zugabe von PEG-SG⁸⁸.

3.2.2.11 Herstellung von Cornea-Äquivalenten

Zur Herstellung von Cornea-Äquivalenten wurden $1 * 10^5$ Zellen/ Well RPE-Zellen auf Polycarbonat-Membranen (8 μm Porengröße) ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Die RPE-Zellen dienten als Ersatz für corneale Endothelzellen. Anschließend wurde quervernetztes oder nicht-quervernetztes Stroma-Äquivalent auf den RPE-Zellen geliert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden $1,5 * 10^5$ Zellen/ Well humaner cornealer

Epithelzellen ausgesät und das Cornea-Äquivalent für 11 Tage kultiviert. Hemi-Cornea-Modelle wurden ohne RPE-Zellen nach demselben Protokoll kultiviert.

3.2.3 Histologie

3.2.3.1 Fixierung von Gewebeproben

Zur histologischen Begutachtung wurden das native Gewebe, Gewebemodelle und Zellen fixiert. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Probe mit PBS⁻ gewaschen. Als nächstes folgte die Fixation der Probe mit Roti-Histofix 4 % für 4 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet.

3.2.3.2 Paraffineinbettung und Schnittpräparation

Die fixierten Proben wurden in einer Einbettkassette mit Papier eingeschlossen. Um Fixierungsreste zu entfernen, wurde die Kassette in Leitungswasser aufbewahrt. Zur Paraffineinbettung wurden die Kassetten in den Wasserbehälter der Einbettmaschine mit folgendem Programm überführt.

Tabelle 10: Programm zur Paraffineinbettung

Schritt	Lösung	Zeit
Auswaschen des Fixans	Leitungswasser	1 Stunde
Dehydrierung	Ethanol 50 %	1 Stunde
	Ethanol 70 %	1 Stunde
	Ethanol 80 %	1 Stunde
	Ethanol 96 %	1 Stunde
	Isopropanol I	1 Stunde
	Isopropanol II	1 Stunde
Entfernen der Alkoholreste	Xylol I	1 Stunde
	Xylol II	1 Stunde
Infiltration mit Paraffin	Paraffin I	1,5 Stunden
	Paraffin II	1.5 Stunden

Anschließend wurden die Proben aus den Einbettkassetten entfernt, geschnitten und in kleinen Metallschalen mit Paraffin aufgeblickt.

Für die Histologie wurden Schnitte mit 3-5 μm angefertigt und über Nacht bei 37°C getrocknet. Für Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden unbeschichtete Objektträger und für immunhistochemische Färbungen mit Polylysin beschichtete Objektträger verwendet.

3.2.3.3 Deparaffinierung und Rehydratation der Gewebeproben

Vor den Färbungen wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert. Die Schnitte wurden bei 60°C für 1 Stunde inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen. Anschließend wurden die Proben nach folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

Tabelle 11: Deparaffinierungs- und Rehydrierungsprotokoll.

Schritt	Lösung	Zeit
Deparaffinisierung	Xylol I	10 Minuten
	Xylol II	10 Minuten
Rehydrierung	Ethanol 96 % I	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 96 % II	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 70 %	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 50 %	3-maliges Eintauchen
	Entmineralisiertes Wasser	Eintauchen bis die Turbulenzen verschwinden

3.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde als erster Analyseschritt eingesetzt, um die Zellvitalität und die Morphologie zu begutachten. Die HE-Färbung wurde im Anschluss an die Deparaffinierung und Rehydrierung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 12: Protokoll HE-Färbung.

Schritt	Lösung	Zeit
Färbung basophiler Strukturen	Hämatoxylin	6-8 Minuten
Abwaschen des Hämatoxylin	Entmineralisiertes Wasser	Bis die Lösung klar bleibt
Bläuen	Leitungswasser	5 Minuten

Schritt	Lösung	Zeit
Färbung acidophiler Strukturen	Eosin	1 Minute
Dehydration	Ethanol 70 %	3-maliges Eintauchen
	Ethanol 96 %	2 Minuten
	Isopropanol I	5 Minuten
	Isopropanol II	5 Minuten
	Xylol I	5 Minuten
	Xylol II	5 Minuten

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden anschließend mit Entellan® eingedeckt.

3.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen wurden zur Identifizierung spezifischer Zellmarker durchgeführt. Der Primärantikörper wurde 1:100 und der Sekundärantikörper 1:400 verdünnt, sofern nicht anders angezeigt. Die Sekundärantikörper wurden entsprechend der Herkunft des Primärantikörpers eingesetzt. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 13: Protokoll Immunfluoreszenzfärbung.

Schritt	Lösung	Zeit
Blocken	Blockpuffer	30 Minuten
Primärantikörperfärbung	Primärantikörper verdünnt in der Antikörperverdünnungslösung	über Nacht bei 4°C
Waschen	TBST	3 x 5 Minuten
Sekundärantikörperinkubation	Sekundärantikörper in der Antikörperverdünnungslösung	60 Minuten
Waschen	TBST	3 x 5 Minuten

Die Gewebeschnitte wurden im Dunkeln gehalten ab der Sekundärantikörperinkubation. Die Proben wurden in Mowiol/ Triethylendiamin (DABCO) mit 0,1 % DAPI oder Fluoromount G eingedeckt und bei 4°C im Dunklen bis zur Mikroskopie aufbewahrt.

3.2.3.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die 48-stündige Fixation der Hydrogele mit 2,5 % Glutaraldehyd in 50 mM Dimethylarsinsäure-Puffer fand bei 4°C statt. Die weitere Verarbeitung dieser Hydrogele und ihre photographische Dokumentation wurde von Prof. Krohne (Universität Würzburg) durchgeführt. Die Proben wurden in einer ansteigenden Acetonreihe dehydriert, bei überkritischer Trocknung eingefroren und mit Gold-Palladium besputtert und einem REM JEOL JSM-7500F mikroskopiert.

3.2.3.7 Transmissionselektroskopie (TEM)

Die Hydrogele wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd in 50 mM Dimethylarsinsäure-Puffer für 48 Stunden bei 4°C fixiert und danach 2 Stunden bei 4°C in 2 % Osmiumsäure getaucht. Auch in diesem Fall lag die weitere Verarbeitung der beschriebenen Hydrogele und ihre photographische Dokumentation in der Verantwortung von Prof. Krohne (Universität Würzburg). Ultradünnschnitte wurden mit 0,5 % Uranylacetat gefärbt, dehydriert mit Ethanol, in Epon 812 eingebettet und mit einem TEM JEOL JEM-2100 mikroskopiert.

3.2.4 Analysemethoden

3.2.4.1 Transparenzmessung der Kollagenhydrogele

Die optische Dichte von 200 µl azellulären quervernetzten und nicht-quervernetzten Kollagenhydrogelen sowie der Kollagenlösung wurde über die Absorption von 500-800 nm in einer 96-Well-Multititerplatte mit flachen Boden im Spektrometer vermessen. Die Transmission wurde aus dem Quotienten von einfallendem Licht und absorbierten Licht gebildet.

3.2.4.2 Mechanische Charakterisierung der Hydrogele

Die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele wurden durch einen Kompressionstest in einer Materialtestmaschine mit einer 2,5 kN Kraftmessdose von Zwick/ Roell Z005 getestet. Die Daten wurden mit der testXpert II-Software erfasst. Nach der Fertigstellung wurden die Hydrogele 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Hydrogele in zylindrischer Form von 1,5 mm Durchmesser und 10 mm Höhe wurden vermessen. Für den Kompressionstest wurde zunächst eine konstante Vorschubgeschwindigkeit von 1 mm/ min eingesetzt, dann bis hin zu einem Abstand von 2 mm zwischen Vorschub und Kreuzkopf. Eine Spannungs-Formänderungskurve wurde während der Messung aufgezeichnet. Der elastische Kompressions-E-Modulus wurde von jeder Probe als Quotient aus Spannung und Formänderung im linearen Teil der Spannungs-Formänderungskurve berechnet.

3.2.4.3 Kollagenase-Assay

Um die Beständigkeit des Hydrogels gegenüber einem enzymatischen Verdau zu evaluieren, wurde ein Kollagenase-Assay durchgeführt. Hierfür wurden 500 μl Hydrogel für 1 Stunde in 1 ml 0,1 M TrisHCl (pH 7,4) mit 50 mM CaCl_2 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die TrisHCL-Lösung mit der Kollagenaselösung (10 U/ mg Kollagenase Typ IV in 0,1 M TrisHCl) ausgetauscht. Nach 14 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 1 ml 0,25 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gestoppt. Nach Vakuumtrocknung wurde die verbleibende Masse auf die nicht verdaute Masse der Kontrolle normalisiert.

3.2.4.4 Viabilitätsbestimmung der Zellen im Hydrogel

Die Viabilität von $1 \cdot 10^5$ humanen dermalen Fibroblasten in quervernetzten und nicht-quervernetzten Hydrogelen wurde nach 21 Tage mittels MTT-Tests bestimmt. Die besiedelten Hydrogele wurden in 3 ml MTT-Lösung (1 g/ ml MTT in PBS^-) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die MTT-Lösung durch Isopropanol ersetzt und für 24°C bei 4°C inkubiert, um das gebildete Formazan zu lösen. Anschließend wurden 200 μl der Formazanlösung bei 570 nm mit einem Spektrometer vermessen.

Zusätzlich wurde Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH) mit einem kommerziell erhältlichen Zytotoxizität-Test bestimmt, um die Zell-Lyse zu untersuchen. Quervernetzte und nicht quervernetzte Hydrogele wurden mit $1 \cdot 10^5$ Zellen/ ml präpariert und für 24 Stunden kultiviert. Zur positiven Kontrolle wurden Hydrogele mit 1 % Triton X-100 in PBS^- für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Quantifizierung der LDH wurden 100 μl des Reaktionsmixes mit 100 μl Überstand aus jeder Probe einer 96-Well-Multititerplatte mit flachem Boden gemischt. Nach 30 Minuten wurde die Umwandlung des Formazans durch die LDH bei 492 nm im Spektrometer ausgemessen.

3.2.4.5 Kontraktionsmessung der stromalen und dermalen Äquivalente

Um die Kontraktion der Hydrogele durch humane primäre stromale oder dermale Fibroblasten zu messen, wurden die Hydrogele über 20 Tage untersucht. Nach der Präparation von quervernetzten und nicht-quervernetzten Hydrogelen mit $2 \cdot 10^5$ Zellen/ ml wurden die besiedelten Hydrogele im Brutschrank bei 37°C kultiviert. 2-mal in der Woche erfolgte der Wechsel des Kulturmediums. Die Messung des Flächeninhaltes erfolgte makroskopisch an den Tagen 1, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 15 und 20.

3.2.4.6 Bestimmung der Epithel-Barriereigenschaften

Die Epithel-Barriereigenschaften wurden anhand der Zeit bestimmt, die eine irritative Substanz braucht, um die Zellviabilität um 50% (ET_{50}) zu senken⁸⁹. Die Modelle wurden hierfür apikal mit 25 μl mit 1 % Triton X-100 in PBS^- bei 37°C für 0,5; 1,5; 3,0; 4,5 und

6 Stunden inkubiert. Zur gleichmäßigen Verteilung wurde das Triton durch Auf- und Abpipettieren aufgeschäumt. Unbehandelte Modelle dienten als negative Kontrolle. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Modelle in 150 ml Behältnissen mit PBS⁻ gewaschen. Für die folgende Viabilitätsbestimmung wurden die Modelle in eine 24-Well-Multititerplatte mit 300 µl 1 mg/ml MTT in PBS⁻ gestellt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Lösen des blauen Formazans wurden die Modelle in eine frische 24-Well-Platte in 2 ml Isopropanol untergetaucht und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Zum Schluss wurden die Insertmembranen durchstoßen und 200 µl der Lösung im Spektrometer bei 570 nm gemessen. Isopropanol wurde als Leerwert eingesetzt.

3.2.4.7 Impedanzspektroskopie

Die Impedanz von RHE, mRHE und RCE wurden in 24-Well-Platen mit einer selbstentwickelten Messapparatur bestimmt (Abbildung 18). Das Insert und das Well wurden jeweils mit 0,5 ml Epilife® Basalmedium gefüllt, um den Kontakt zu den Elektroden zu gewährleisten. Wie zuvor beschrieben, fand die Messung für jedes Modell über den Frequenzbereich von 1 Hz - 100 kHz an 40 logarithmisch verteilten Punkten statt⁹⁰. Um die Impedanz als Spektrum $Z(f)$ von biologischen Proben aufzuzeichnen, wurde ein sinusoidaler elektrischer Strom $I(f)$ [A] generiert und die Potentialdifferenz $U(f)$ [V] durch ein Impedanzspektrometer LCR HiTESTER 3522-50 gemessen. Eine maßgeschneiderte Benutzeroberfläche wurde in LabVIEW programmiert und hat $Z(f)$ aus nachstehender Gleichung berechnet: $Z(f) = U(f) / I(f)$.

3.2.5 In vitro-Augenreizungstest

Der Augenirritationstest wurde aus dem Testprotokoll OECD Richtlinie 492 abgeleitet⁸². Die Impedanz der Modelle wurde zuerst vor dem Test gemessen. Die Modelle wurden mit 20 µl PBS⁺ befeuchtet. 50 µl von flüssigen Testsubstanzen wurden in Duplikaten für 30 Minuten inkubiert, dreimal gewaschen, in einer 12-Well-Multititerplatte mit 2,5 ml Kulturmedium für 12 Minuten eingetaucht und für 120 Minuten unter normalen Kulturbedingungen im Brutschrank inkubiert. 50 mg von festen Testsubstanzen wurden in Duplikaten für 6 Stunden appliziert, dreimal gewaschen, in einer 12-Well-Multititerplatte mit 2,5 ml Kulturmedium für 25 Minuten eingetaucht und für 18 Stunden unter normalen Kulturbedingungen im Brutschrank inkubiert. PBS⁻ kam als Negativkontrolle und 5 % Natriumlaurylsulfat als positive Kontrolle zum Einsatz. Im Anschluss erfolgte eine erneute Messung der Impedanz. In der Folge fanden Wiederholungs-Messungen an den Tagen 1, 3, 7 und 11 statt. Danach wurde der MTT-Test wie zuvor beschrieben durchgeführt und in einem Spektrometer bei 570 nm gemessen. Isopropanol wurde als Leerwert verwendet.

Tabelle 14: Liste der Testsubstanzen für den Augenreizungstest. Für alle Testsubstanzen wurde die CAS-Nummer (Chemical Abstract Service) und die Klassifizierung nach dem UN-GHS-System hinzugefügt.

Testsubstanz	CAS-Nummer	GHS-Kategorie
Glycerol	56-81-5	“keine Kategorie”
Kaliumtetrafluorobat	14075-53-7	“keine Kategorie”
Toluol	108-88-3	“keine Kategorie”
Aceton	67-64-1	Kategorie 2
Ethanol	64-17-5	Kategorie 2
Citrat	77-92-9	Kategorie 2
Imidazol	288-32-4	Kategorie 1
10 % Benzalkoniumchlorid	8001-54-5	Kategorie 1
15 % Natriumlaurylsulfat	151-21-3	Kategorie 1

3.2.5.1 Statistische Auswertung

Die Datensätze wurden auf Normalität hin mit dem D’Agostino-Pearson-Omnibus-Test untersucht. Bei Normalverteilung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) beziehungsweise bei nicht vorliegender Normalverteilung der Kruskal-Wallis-Test in Verbindung mit Dunnett’s-Post-Test durchgeführt. Die Erstellung der statistischen Analysen und die graphische Gestaltung wurden mit GrapPad PRISM 6 durchgeführt. Werte $p < 0,05$ wurden als signifikant eingestuft.

4 Ergebnisse

Zur Entwicklung eines alleinstehenden in vitro-Tests, der alle GHS-Kategorien für Augenirritation erkennt, wurden das Cornea-Modell und die Analysemethode überarbeitet. Als erstes wurde die Etablierung eines Modells mit primären humanen Zellen untersucht. Als zweites folgte die Einsetzung eines final nicht-destruktiven Messsystems basierend auf der Impedanzspektroskopie, um die Sensitivität der Analyse zu verbessern. Drittens ergab die Kombination aus Cornea-Modell und Impedanzspektroskopie schließlich die Möglichkeit, alle GHS-Kategorien in Bezug auf die Augenreizung in einem Verfahren zu identifizieren.

4.1 Der Einfluss verschiedener Zellquellen für die Generierung von Cornea-Modellen

Humane primäre Zellen sind eine wichtige Ressource für organotypische Gewebemodelle für die präklinische Forschung. Sie rekapitulieren die Proteinexpression und den Metabolismus der Cornea in vivo und bilden somit Teile der nativen Funktion und Anatomie des Gewebes wieder ab. Um herauszufinden, ob der Zellursprung Einfluss auf die Risikoanalyse des Augenreizungspotentials hat, wurden primäre humane Epithelzellen aus Cornea und Haut eingesetzt, um daraus Gewebemodelle herzustellen.

4.1.1 Die primären cornealen Zellen erhalten ihre native Marker

Um die bestehenden Modelle der Testmethoden, die hauptsächlich aus Zelllinien oder primären Hautzellen bestehen, zu verbessern, sollen neue Modelle von primären cornealen Zellen etabliert werden. Deshalb wurden die drei Hauptzelltypen der Cornea: Epithelzellen, Stromazellen und Endothelzellen isoliert. Die cornealen Zellen konnten über einen enzymatischen Verdau und anschließendes Abziehen isoliert werden. Die isolierten cornealen Epithelzellen zeigten die typische „Kopfsteinpflaster“-Morphologie und wuchsen zu einem dichten Monolayer zusammen. Die immunhistochemische Färbung zeigt den epithelialen Charakter mit Zytokeratin 14 sowie den cornea-spezifischen Marker Zytokeratin 3/12⁹¹. Die stromalen Zellen konnten nach dem Abziehen des Epithels durch Kollagenase-Verdau des Stromas gewonnen werden. Die Stromazellen, auch als Keratozyten oder stromale Fibroblasten bekannt, wiesen die typisch fibroblastäre Spindelform auf. Die Zellen färbten positiv in Bezug auf Vimentin, einem Fibroblasten-Marker, und in Bezug auf die zellspezifische Aldehyd-Dehydrogenase 3A1⁹². Die Endothelzellen wurden nach der „Big Bubble“-Technik isoliert⁹³. Durch das Einführen einer Blase zwischen Stroma und Descemet-Membran konnte das Endothel auf der Descemet-Membran isoliert werden. Die Endothelzellen bildeten eine hexagonale Form auf der Descemet-Membran. Die Zellen konnten mit einem Trypsin-Verdau von der Membran getrennt werden, jedoch überlebten nur wenige Zellen den Prozess (Abbildung 7A). Die isolierten Zellen wurden

weiterhin auf ihr Wachstumspotential *in vitro* untersucht. Hierfür wurde die Wachstumsgeschwindigkeit über drei Passagen evaluiert. Die Stromalen Zellen wiesen hier die meisten Zellteilungen auf, gefolgt von den Epithelzellen. Jedoch nahm bei beiden die Wachstumsgeschwindigkeit ab. Bei den Epithelzellen endete das Wachstum nach der dritten Passage. Die Endothelzellen proliferierten nicht in der Zellkultur (Abbildung 7B).

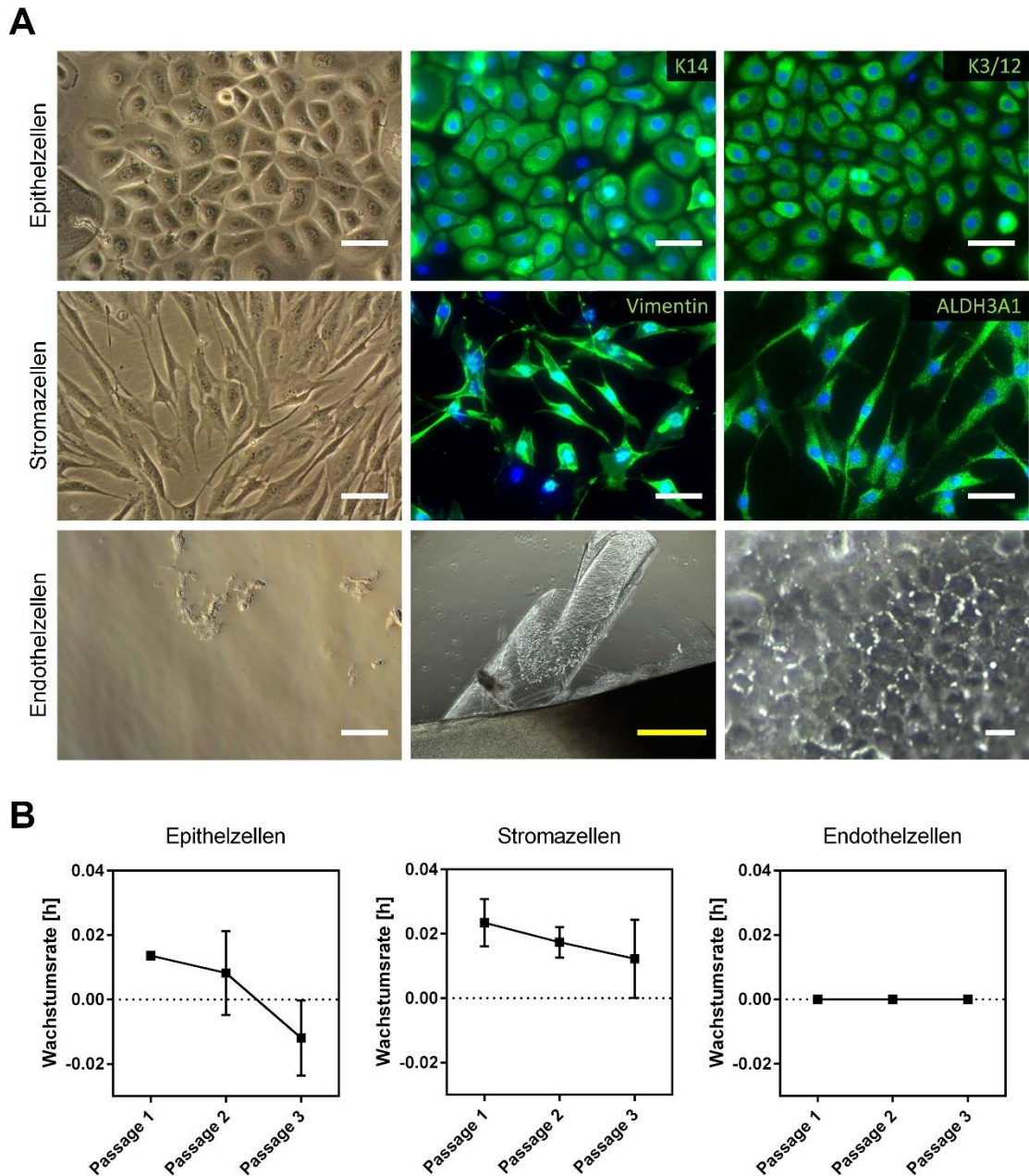


Abbildung 7: Charakterisierung der isolierten cornealen Epithel-, Stroma- und Endothelzellen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der cornealen Epithel-, Stroma- und Endothelzellen. Die weißen Maßstabsbalken entsprechen 20 μm und der gelbe 1000 μm , Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen mit Zytokeratin 14 (K14), Zytokeratin 3/12 (K3/12), Vimentin und Aldehyd-Dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1). Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm . (B) Wachstumsgeschwindigkeit der cornealen Epithelzellen ($n=2$; Mittelwert \pm Standardabweichung), stromale Zellen ($n=3$; Mittelwert \pm Standardabweichung) und Endothelzellen ($n=3$; Mittelwert \pm Standardabweichung) über drei Passagen.

4.1.2 Die Cornea Epithelmodelle können aus primären Cornea- und Hautzellen generiert werden

Zur Generierung eines dreidimensionalen in vitro-Modells für den Augenreizungstest sollte ein unverhorntes mehrschichtiges Epithel aus primären cornealen und epidermalen Epithelzellen generiert werden. Die Differenzierung der Zellen zu mehrschichtigen Epithelien konnte mithilfe der Kultur an der Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche induziert werden. Für das RCE wurden primäre humane corneale Epithelzellen von post-mortem-Spendern verwendet. Verschiedene Medien wurden getestet, um die optimalen Konditionen zur Kultur zu erreichen. Die Zellen formten 2-3 unverhornte Schichten nach 7 Tagen und 5 Schichten nach 11 Tagen. Nach 11 Tagen fing das Epithel an, eine Hornschicht zu bilden. Die Schichtzahl von 4-5 blieb über die gesamte untersuchte Kulturdauer von 21 Tagen konstant (Abbildung 8A). Des Weiteren konnten Modelle aus den nah verwandten epidermalen Epithelzellen etabliert werden. Aus den humanen epidermalen Zellen wurde das RHE über 21 Tage kultiviert. Die Zellschichten nahmen an Tag 7 bis zu 5-6 Schichten, an Tag 21 bis zu 9-10 Schichten zu. Insofern war die Identifikation der unterschiedlichen Epidermis-Schichten von Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum möglich (Abbildung 8B).

Die parallel etablierte TEER-Wert-Messung bei einer Frequenz von 1000 Hz ($TEER_{1000\text{ Hz}}$, vgl. S.65) über den Aufbau des RCEs wies einen Anstieg von $192\ \Omega\text{cm}^2$ an Tag 7, bis $1390\ \Omega\text{cm}^2$ an Tag 14. Nach 21 Tagen pendelte sich das Epithel bei einem $TEER_{1000\text{ Hz}}$ von $1224\ \Omega\text{cm}^2$ ein. Die Standardabweichung zwischen den sechs Spendern nahm mit $55\ \Omega\text{cm}^2$ an Tag 7, bis $2049\ \Omega\text{cm}^2$ an Tag 21 zu (Abbildung 8C). Der $TEER_{1000\text{ Hz}}$ stieg stetig über die Kultivierung des RHE an mit $1128\ \Omega\text{cm}^2$ an Tag 7, bis $3886\ \Omega\text{cm}^2$ an Tag 21 (Abbildung 8D). Das Ziel der Versuchsreihe war ein unverhorntes mehrschichtiges Cornea-Epithel in vitro zu generieren. Die Modelle zeigten die höchste histologische Übereinstimmung mit nativer Cornea an Tag 11, an dem die Modelle 4-6 unverhornte Zelllagen aufweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Kulturdauer von 11 Tagen für das RCE und die modifizierte rekonstruierte Epidermis (mRHE) gewählt.

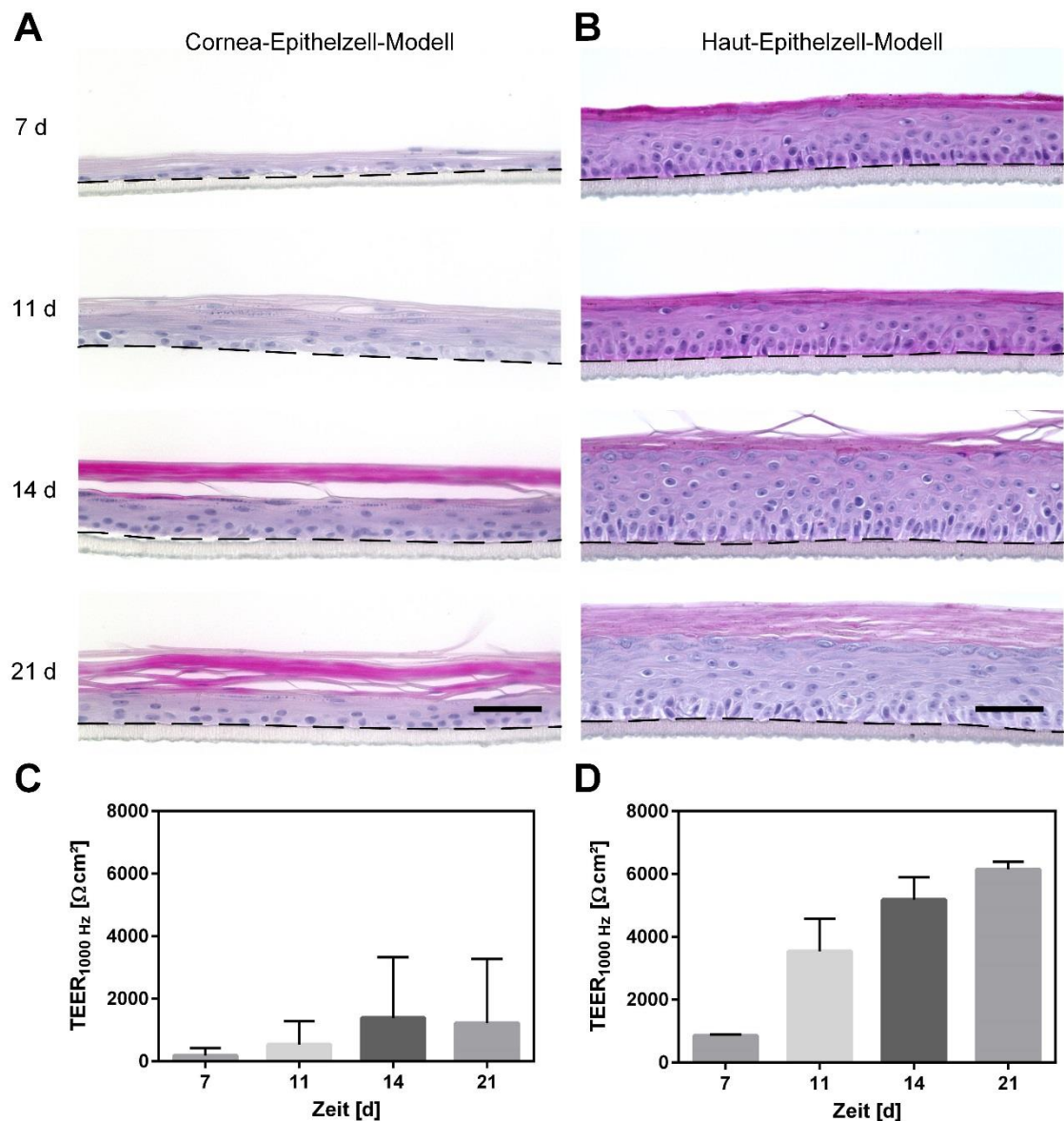


Abbildung 8: Charakterisierung der cornealen und epidermal generierten in vitro-Modelle. HE-Färbungen über die Entwicklung der in vitro-Modelle aus (A) primären humanen cornealen Epithelzellen oder aus (B) primären humanen epidermalen Epithelzellen - kultiviert an der Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche in E3-Medium. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm . TEER_{1000 Hz}-Messung über die Entwicklung der in vitro-Modelle generiert aus (C) primären humanen epidermalen Epithelzellen oder aus (D) primären humanen epidermalen Epithelzellen über 21 Tage. (n=6; Mittelwert \pm Standardabweichung).

4.1.3 Die Herkunft der primären Zellen definiert die Anatomie, das Proteinmuster und die Barriereigenschaften der Cornea-Modelle

Im nächsten Schritt wurden die epithelialen Modelle mit der nativen Cornea und Haut verglichen. Die native Cornea wies eine spezifische Zytokeratin 3/12-Färbung auf wie auch das RCE, aber keines der anderen Modelle. Zytokeratin 1, ein spezifischer Marker für die Epidermis, wurde im mRHE, RHE und der nativen Haut gefunden, aber nicht in der Cornea oder dem RCE. Zytokeratin 14, das generell in Epithelien exprimiert wird,

befand sich in allen Modellen und den nativen Geweben. Loricrin, ein Marker des „Cornified Envelopes“, färbte alle Modelle und Gewebe⁹⁴. Jedoch war die Loricrin-Distribution unterschiedlich. In der nativen Haut, RHE und mRHE besaßen nur die obersten Schichten Loricrin. Hingegen ergaben die Cornea und das RCE-Modell über alle Schichten positive Ergebnisse für Loricrin. Involucrin, ein weiteres Protein des „Cornified Envelopes“, befand sich in den obersten Schichten aller gefärbten Modelle und Gewebe (Abbildung 9A)^{95,96}. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Färbungen findet sich in Tabelle 15.

Um herauszufinden, ob die Zellquelle und das spezifische Proteinmuster sich auf die Barriereigenschaften auswirken, wurde ein ET₅₀-Assay durchgeführt. Durch die Inkubation der Modelle mit der irritativen Substanz Triton X-100 über einen bestimmten Zeitraum konnten die Modelle nach dem Zeitpunkt, an dem die Hälfte der Zellen im MTT-Test noch metabolisch aktiv waren, aufgetrennt werden. Das RHE ist mit einem ET₅₀-Wert von 5,4 Stunden weniger sensibel gegen Triton X-100 als das mRHE mit 1,1 Stunden oder das RCE mit 0,6 Stunden. Im ET₅₀ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem RCE und mRHE gefunden werden (Abbildung 9B).

Die Messung des parallel entwickelten TEER_{1000 Hz} (vgl. S.65) hingegen demonstrierte signifikante Unterschiede zwischen RHE, mRHE und RCE, welche nicht im ET₅₀-Test detektiert werden konnten (Abbildung 9B). Das RHE hat den höchsten TEER_{1000 Hz}-Wert mit $8726 \pm 2051 \Omega\text{cm}^2$, gefolgt vom mRHE mit $3718 \pm 1242 \Omega\text{cm}^2$ und dem RCE mit dem niedrigsten Wert von $684 \pm 211 \Omega\text{cm}^2$, vergleichbar mit den ET₅₀-Werten. Allerdings führten die sensitiveren TEER_{1000 Hz}-Messungen im Vergleich zu den MTT-basierten ET₅₀-Messungen zu statistisch signifikanten Unterschieden zwischen dem RHE und mRHE, RHE und RCE als auch zwischen mRHE und RCE (Abbildung 9C).

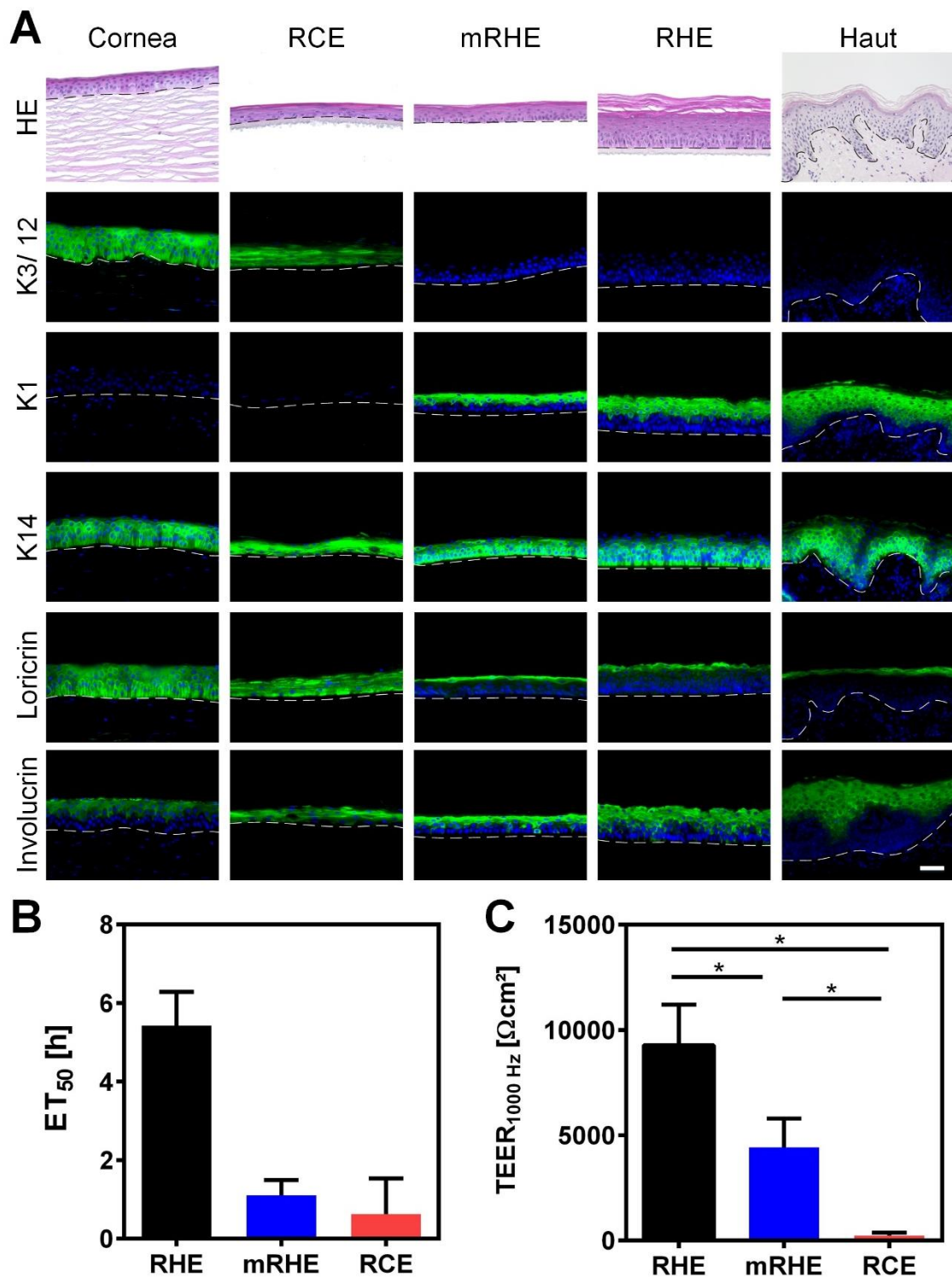


Abbildung 9: Vergleich der Epithelmodelle. (A) HE-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung der nativen Cornea, nativen Haut, rekonstruierten humanen Epidermis (RHE), modifizierte rekonstruierte humane Epidermis (mRHE) und rekonstruiertes humanes corneales Epithelium (RCE). Immunfluoreszenzfärbungen mit Zytokeratin 1 (K1), Zytokeratin 3/12 (K3/12), Zytokeratin 14 (K14), Loricrin und Involucrin. Der Maßstabballen entspricht 20 μm . (B) ET₅₀-Assay, um die Barriereigenschaften, der rekonstruierten humanen Epidermis (RHE), der modifizierten rekonstruierten humanen Epidermis (mRHE) und der rekonstruierten humanen cornealen Epitheliums (RCE) zu evaluieren (n=3; Mittelwert \pm Standardabweichung). (C) Transepithelialer elektrischer Widerstand bei 1000 Hz gemessen (TEER_{1000 Hz}) von der rekonstruierten humanen Epidermis (RHE), modifizierten rekonstruierten humanen Epidermis (mRHE) und des rekonstruierten cornealen Epithel (RCE) (n=30; Mittelwert \pm Standardabweichung; *p<0.05).

Tabelle 15: Zusammenfassung der gefärbten Marker der verschiedenen Modelle und nativen Gewebe. Gefärbte Marker: Zytokeratin 3/12 (K3/12), Zytokeratin 1 (K1) und Zytokeratin 14 (K14), Loricrin und Involucrin.

	Cornea	RCE	mRHE	RHE	Haut
K3/12	+	+	-	-	-
K1	-	-	+	+	+
K14	+	+	+	+	+
Loricrin	+	+	+ (apikal)	+ (apikal)	+ (apikal)
Involucrin	+	+	+	+	+

4.1.4 Die Retinsäure kann die Verhornung in den Hautzell-basierten Modellen reduzieren

Mit dem Ziel, das etablierte RHE zu einem Corneaepithel zu entwickeln, wurden verschiedene Medienzusätze getestet (Wnt3a, Wnt7, Ascorbinsäure, Noggin, ROCK-Inhibitor, DMSO), die die Verhornung unterdrücken und die Hautzellen zu Cornea-Zellen transdifferenzieren. Bei den getesteten Zusätzen demonstrierten die Zugaben von Calcium und Retinsäure (Vitamin A) die ausgeprägtesten Wirkungen (Abbildung 10). Die Reduktion von 1,5 mM Calcium im Luft-Flüssigkeitsphasen-Medium unter 0,5 mM führte zu einer reduzierten Verhornung. Zusätzlich stagnierten die Zellschichten zwischen 2-4 (Abbildung 10A). Retinsäure unterdrückte die Verhornung schon bei sehr geringen Konzentrationen von 10^{-7} mM (Abbildung 10B). Des Weiteren veränderte die Zugabe von Retinsäure die Marker-Expression. Die Addition von 10^{-5} mM Retinsäure nach 5 Tagen Kultur des Modells offenbarte die Reduktion des Epidermis-spezifischen Zytokeratins 1 und Loricrins. Zytokeratin 14, 3/12 und Involucrin haben sich nicht verändert (Abbildung 10C).

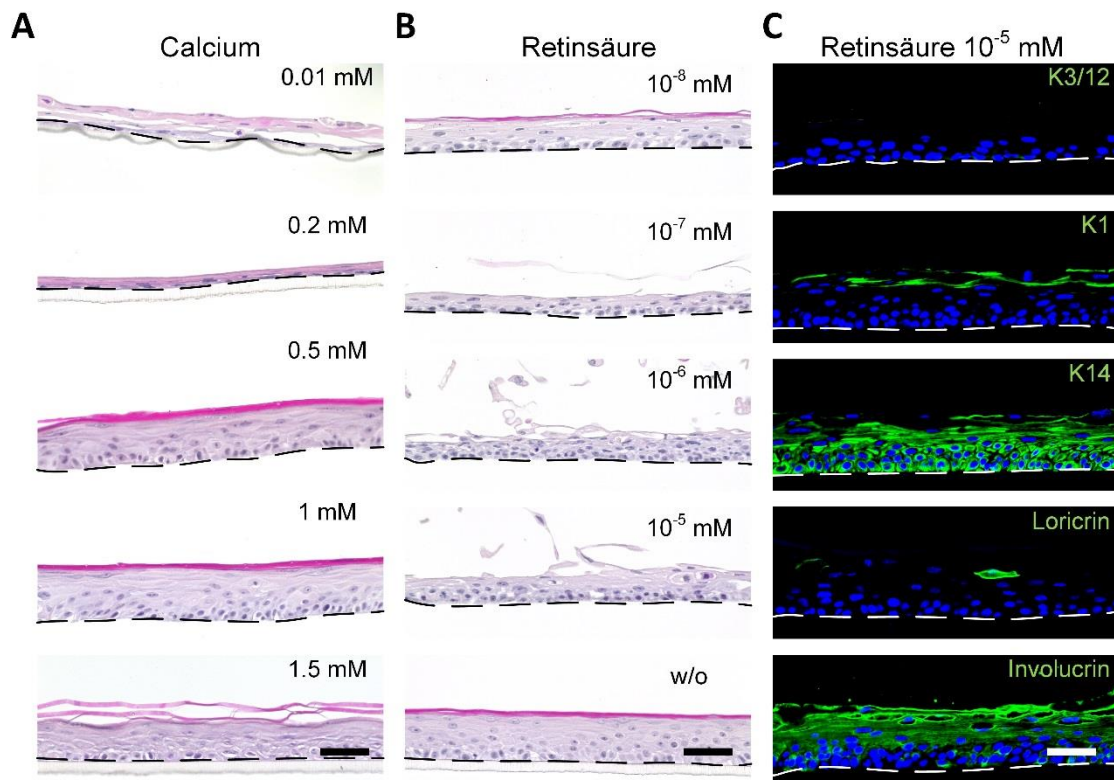


Abbildung 10: Cornea-Modelle kultiviert mit Calcium oder Retinsäure. (A) Rekonstruierte humane Epidermis (RHE) kultiviert für 7 Tage mit verschiedenen Calciumkonzentrationen. (B) Rekonstruierte humane Epidermis (RHE) kultiviert für 7 Tagen mit verschiedenen Retinsäurekonzentrationen. Maßstabsbalken entspricht 20 μm . (C) Rekonstruierte humane Epidermis (RHE) kultiviert für 10 Tage. Nach 5 Tagen wurde 10^{-5} mM Retinsäure zugegeben. Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin 14 (K14), Zytokeratin (K1), Zytokeratin 3/12 (K3/12), Loricrin und Involucrin. Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

4.2 Die Fabrikation eines Stroma-Äquivalents

Zur Erweiterung der Kapazität der Modelle, irritative Chemikalien zu identifizieren, sollte das Epithelium um ein Stroma-Äquivalent erweitert werden⁸. Drei verschiedene Ansätze wurden getestet, um ein Stroma-Äquivalent zu generieren: Selbst-synthetisiertes Kollagen, Kollagenhydrogele und quervernetzte Kollagenhydrogele.

4.2.1 Die Stromazellen synthetisieren selber kleine Mengen an Kollagen

Im ersten Ansatz sollte das Stroma durch primäre stromale Zellen oder Hautfibroblasten selbst synthetisiert werden. Durch die Zugabe von Ascorbyl-2-Phosphat wurden die Zellen angeregt, Kollagen zu produzieren⁹⁷. Die stromalen Zellen produzierten einige Schichten an extrazellulärer Matrix im Insert und in der Multititerplatte. In der Multititerplatte bildeten sich mehr Zellschichten und mehr Matrixablagerungen. Die dermalen Fibroblasten produzierten insgesamt mehr Zellschichten und Kollagen als die stromalen Zellen in beiden Kultursystemen. Zusätzlich kontrahierte die produzierte Kollagenzellschicht nach 25 Tagen. Zusammengenommen erreichte die Kollagenablagerung keine

100 μm in der Höhe (Abbildung 11A). Um herauszufinden, ob mehr Matrix von den stromalen Zellen produziert wird, wurde die Kulturdauer auf 50 Tage und die Zugabe von Ascorbyl-2-Phosphat auf 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Insertsystem erhöht. Dennoch konnten nur 4-5 Zellschichten mit geringen Kollagenablagerungen produziert werden (Abbildung 11B).

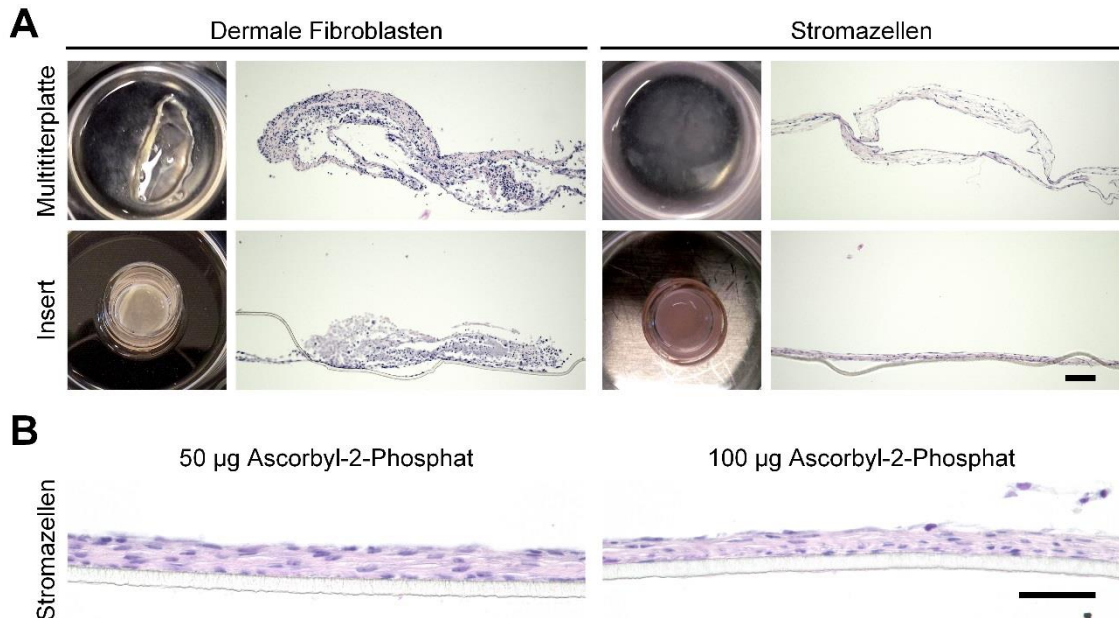


Abbildung 11: Kollagensynthese der primären humanen stromalen Zellen und Hautfibroblasten. 10^5 stromale Zellen oder Hautfibroblasten wurden in einer Multititerplatte oder einem Insert ausgesät und für (A) 30 Tage beziehungsweise (B) 50 Tage in Fibroblasten-Medium mit (A) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beziehungsweise (B) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ascorbyl-2-Phosphat kultiviert. Makroskopische Aufnahmen und HE-Färbungen wurden durchgeführt, um die Entwicklung der Biomasse zu evaluieren. Der Maßstabsbalken entspricht (A) 50 μm und (B) 20 μm .

4.2.2 Die stromalen Zellen proliferieren und kontrahieren das Kollagenhydrogel

Weil die Kollagensynthese der Zellen nicht ausreichend Matrix produzierte, um ein 500 μm dickes Stroma zu imitieren, wurden zudem Kollagenhydrogele eingesetzt. Ratten- und Rinderkollagen wurden mit verschiedenen Zellkonzentrationen untersucht. Die HE-Färbung demonstrierte eine gleichmäßige Verteilung der stromalen Zellen in den Hydrogelen (Abbildung 12A). Die Hydrogele aus Rinderkollagen wiesen eine lockerere Konsistenz auf. Sowohl die Ratten- als auch die Rinderkollagenhydrogele waren im gelierten Zustand trüb. Zur weiteren Evaluierung der Zellen im Rattenschwanzhydrogel wurde eine Proliferationsstudie durchgeführt (Abbildung 12B). Die stromalen Zellen proliferierten zunehmend über die 20 Tage, bis bei ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Gel eine Wachstums-Saturierung erreichten. Schließlich wurde der Einfluss der Zellen auf das Rattenschwanzhydrogel anhand der Kontraktion gemessen. Keine Kontraktion der Hydrogele wurde über die ersten 15 Tage beobachtet. Erst an Tag 20 waren die Hydrogele um 29,3 % geschrumpft (Abbildung 12C).

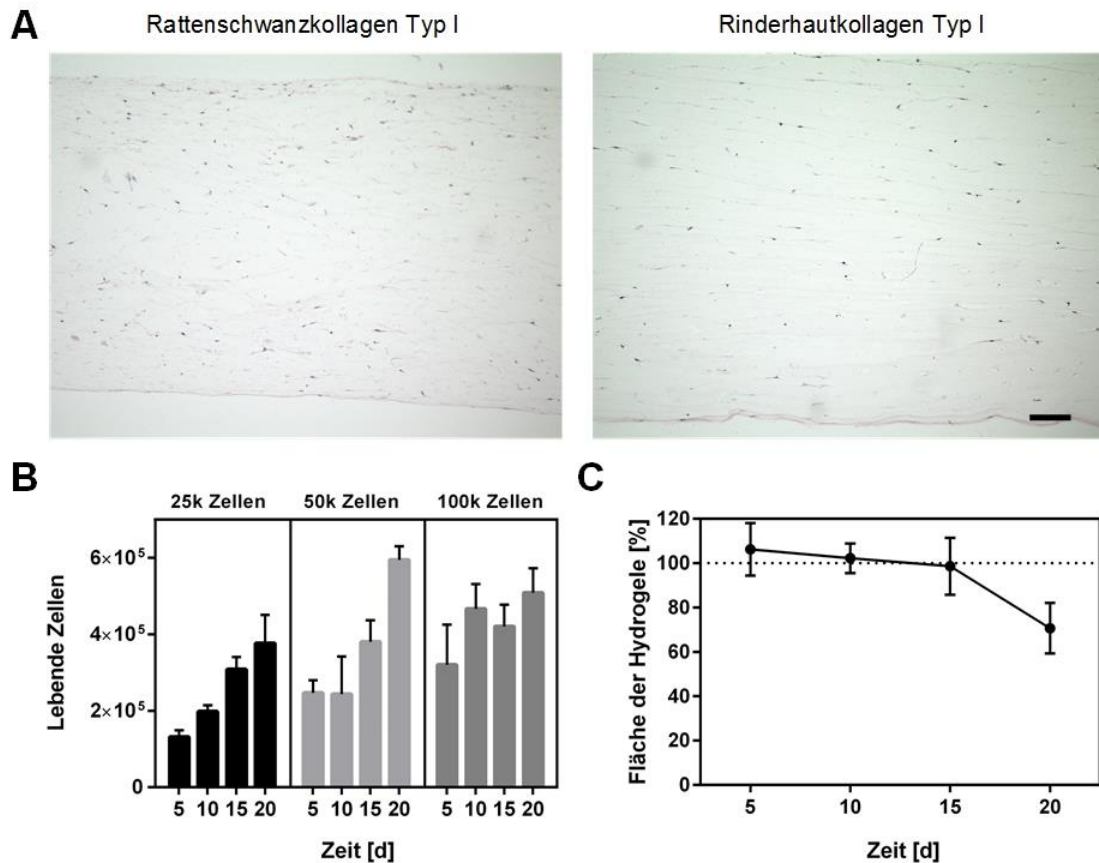


Abbildung 12: Primäre humane stromale Zellen kultiviert in Kollagenhydrogelen. (A) HE-Färbung des Rattenschwanz-Kollagenhydrogels und des Rinderkollagenhydrogels mit $5 \cdot 10^4$ stromalen Zellen besiedelt. Der Maßstabsbalken entspricht $100 \mu\text{m}$ (B) Untersuchung der Proliferation der stromalen Zellen im Rattenschwanzkollagen. $2,5 \cdot 10^4$ (25K); $5 \cdot 10^4$ (50k) und $1 \cdot 10^5$ (100k) stromalen Zellen wurden in Rattenschwanzkollagen ausgesät. Alle 5 Tage wurden die Hydrogele mit Kollagenase verdaut und die Zellen mit Trypan-Blau gezählt für 20 Tage ($n=3$; Mittelwert \pm Standardabweichung). (C) Kontraktionsstudie der besiedelten Kollagenhydrogele. Zur Kontraktionsmessung der mit stromalen Zellen besiedelten Kollagenhydrogele wurde über 20 Tage die Oberfläche makroskopisch vermessen ($n=3$; Mittelwert \pm Standardabweichung).

4.2.3 Die Etablierung eines quervernetzten Stroma-Äquivalents

Zur Imitation der starren mechanischen Eigenschaften und der Transparenz des menschlichen Cornea-Stromas wurden die Kollagenhydrogele mit PEG-SG quervernetzt.

4.2.3.1 Die Quervernetzung mit PEG-SG erhöht die Transparenz und verbessert die mechanischen Eigenschaften

Die Quervernetzung der Kollagenhydrogele mit vier-armigen PEG-SG wurde getestet, um die Transparenz und die mechanischen Eigenschaften zu verbessern (Abbildung 13A). Die quervernetzten Kollagenhydrogele waren nach der Gelierung transparent im Gegensatz zu den trüben Kollagenhydrogelen (Abbildung 13B). Zur Quantifizierung der optischen Eigenschaften wurde die Transmission des sichtbaren Lichts zwischen den

Wellenlängen 500-800 nm der Kollagenlösung, dem Kollagenhydrogel und dem quervernetzten Kollagenhydrogel gemessen (Abbildung 13B). Für die Kollagenlösung und die quervernetzten Kollagenhydrogele zeigte sich die Transmission gleichbleibend hoch über die gemessenen Wellenlängen im Gegensatz zum Kollagenhydrogel, das eine ansteigende Transmission über die Wellenlänge verzeichnete. Da die Transmission bei 500 nm den größten Unterschied aufwies, wurde diese Wellenlänge gewählt, um die optischen Eigenschaften zu vergleichen. Die Kollagenlösung zeigte eine Transmission von $78,5 \pm 1,6 \%$. Nach Gelierung der nicht quervernetzten Kollagenhydrogele betrug die Transmission nur noch $23,8 \pm 0,3 \%$. Die quervernetzten Hydrogele erzielten hingegen signifikant höhere Transmissionen mit $88,4 \pm 1,2 \%$ für PEG-SG₅₀ und $89,6 \pm 0,3 \%$ für PEG-SG₁₀₀ (Abbildung 13B).

Die Untersuchung des Elastizitätsmoduls der Hydrogele diente dazu, die Auswirkungen der Quervernetzung auf die mechanischen Eigenschaften zu untersuchen (Abbildung 13C). Mit PEG-SG₅₀ stieg das E-Modul signifikant von 315 Pa für das nicht quervernetzte Kollagenhydrogels auf 557 Pa an. Mit PEG-SG₁₀₀ wurde ein E-Modul von 1225 Pa erreicht. Da die chemische Quervernetzung des Kollagenhydrogels die Kollagenfibrillen weniger anfällig für den enzymatischen Verdau machen kann, erfolgte die Durchführung einer Kollagenase-Degradation. Die genutzte Kollagenase katalysiert die hydrolytische Spaltung von einzelnen Kollagenketten sowie der Tripel-Helix-Struktur. Hierfür wurden Kollagenhydrogele mit und ohne Quervernetzung generiert und 14 Stunden mit Kollagenase verdaut (Abbildung 13D). Die nicht quervernetzten Kollagenhydrogele degradierten statistisch signifikant schneller und hatten nach 14 Stunden nur $3 \pm 2 \%$ ihrer ursprünglichen Masse. Im Kontrast dazu hatten die PEG-SG₅₀-Kollagenhydrogele noch $35 \pm 9 \%$ ihrer initialen Masse. Eine noch höhere Stabilität zeigten die PEG-SG₁₀₀-Kollagenhydrogele mit einer verbleibenden Masse von $60 \pm 5 \%$ ⁸⁸.

4.2.3.2 Die Quervernetzung verändert das Kollagengefüge

Die Hinzuziehung von REM- und TEM-Aufnahmen hatte zum Ziel, Einsichten in die Ultrastruktur des Kollagenhydrogels und des quervernetzten Kollagenhydrogels zu erlangen. Die TEM-Aufnahmen offenbarten die dicht gepackten Kollagenfibrillen im Kollagenhydrogel mit dem typischen Bänderungsmuster durch die versetzte Anordnung der Kollagenmoleküle⁹⁸. In den quervernetzten Kollagenhydrogelen mit PEG-SG₅₀ waren nur wenige Kollagenfibrillen zu identifizieren. Bei den mit PEG-SG₁₀₀ vernetzten Hydrogelen waren keine Kollagenfibrillen-Strukturen zu finden. Dafür bildeten sich dünne, fibrillenartige Strukturen von ca. 5 nm Durchmesser, die gleichmäßig verteilt waren.

Die Ultrastruktur des Kollagens wurde auch unter dem REM betrachtet. (Abbildung 13E). Die Kollagenfibrillen mit ca. 70 nm Dicke erschienen im Kollagenhydrogel gleichmäßig und homogen verteilt. Die Struktur des PEG-SG₅₀-Kollagenhydrogels zeigte nicht die klassische Kollagenstruktur. Nur einzelne Kollagenfibrillen konnten identifiziert werden.

Die PEG-SG₁₀₀-Kollagenhydrogele bildeten keine Kollagenfibrillen und erschienen noch dichter als das PEG-SG₅₀-Kollagenhydrogel⁸⁸.

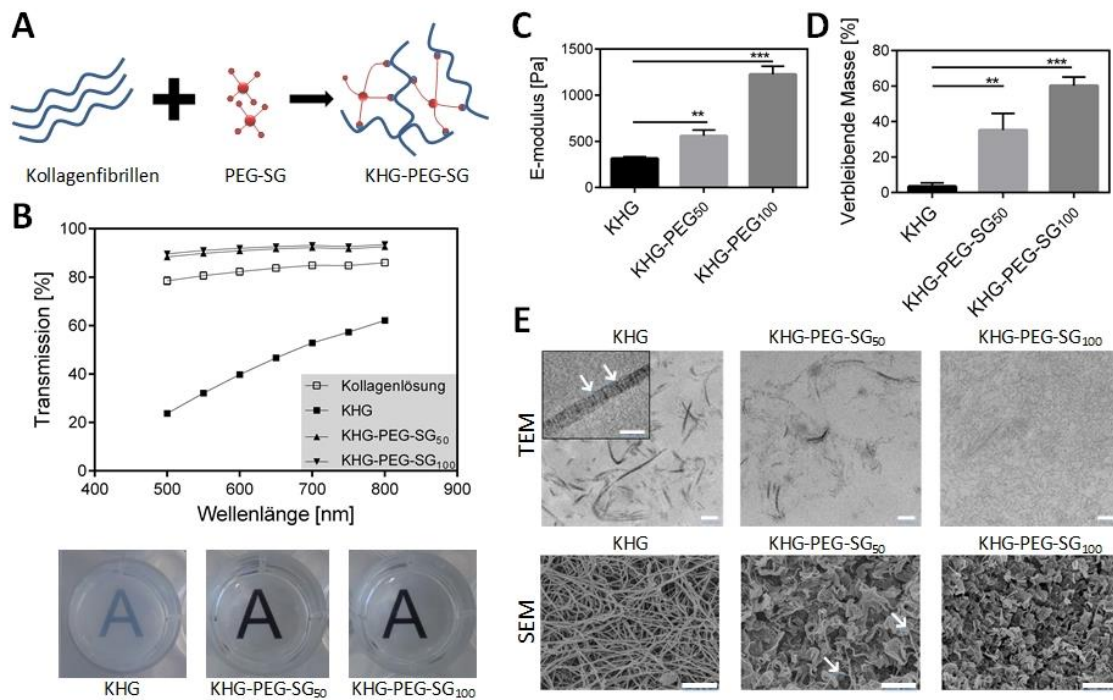


Abbildung 13: Materialeigenschaften der PEG-SG quervernetzten Kollagenhydrogele. (A) Schematische Darstellung der Quervernetzung mit PEG-SG. (B) Optische Eigenschaften der Hydrogele. Makroskopische Aufnahmen des Kollagenhydrogels (KHG) und des quervernetzten Kollagenhydrogels mit PEG-SG₅₀ (KHG-PEG-SG₅₀) und PEG-SG₁₀₀ (KHG-PEG-SG₁₀₀) (unten). Die Transmission der verschiedenen Hydrogele und der Kollagenlösung wurde in einem Absorptions-Scan von 500-800 nm untersucht (oben), (n=5 technische Replikate; Mittelwert ± Standardabweichung). (C) Mechanische Charakterisierung der Kollagenhydrogele dargestellt als Elastizitätsmodul. Das Elastizitätsmodul berechnet sich aus dem Spannungs-Dehnungsverhältnis im linearen Bereich der Spannungs-Dehnungskurve des Kompressionstests (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung; **p < 0,01, ***p < 0,001). (D) Enzymatische Degradation der Kollagenhydrogele. Quervernetzte Kollagenhydrogele (KHG-PEG-SG₅₀ und KHG-PEG-SG₁₀₀) wurden generiert und 14 Stunden mit Kollagenase behandelt. Zur Kontrolle dienten unvernetzte Kollagenhydrogele (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung; **p < 0,01, ***p < 0,001). (E) Ultrastrukturelle Analyse mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) und dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) der azellulären quervernetzten und nicht quervernetzten Hydrogele. Die weißen Pfeile in der TEM-Aufnahme deuten auf das typische Bänderungsmuster der Kollagenfibrillen hin. Der Maßstabsbalken in den TEM-Aufnahmen entspricht 280 nm. Die weißen Pfeile in der REM-Aufnahme deuten auf kollagenfibrillenartige Strukturen hin. Der Maßstabsbalken in den TEM-Aufnahmen entspricht 1 µm.

4.2.3.3 Die Zellviabilität hängt von der PEG-SG Konzentration ab

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Quervernetzung mit PEG-SG einen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Hierfür wurde ein MTT-Test durchgeführt und das Ergebnis auf nicht quervernetztes Kollagenhydrogel normalisiert. Nach 21 tägigen Kultur führte das PEG-SG₅₀ zu einer Viabilität von $110,9 \pm 10,7$ %, wohingegen die Viabilität auf $60,2 \pm 6,5$ % für PEG-SG₁₀₀ sank (Abbildung 14A). Zusätzlich wurde die Anwesenheit

von lysierten Zellen durch die Quantifizierung von LDH im Kulturmedium untersucht. Als Positivkontrolle diente die Behandlung nicht quervernetzter Kollagenhydrogele mit 1 %iger Tritonlösung. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem LDH-Spiegel im nicht quervernetzten Kollagenhydrogel (1,1 [a.u.]), im quervernetzten Kollagenhydrogel mit PEG-SG₅₀ (1,1 [a.u.]) und dem quervernetzten Kollagenhydrogel mit PEG-SG₁₀₀ (1,1 [a.u.]) festgestellt werden. Eine signifikant höhere Absorption mit 1,9 [a.u.] konnte lediglich in der Positivkontrolle beobachtet werden (Abbildung 14B)⁸⁸.

4.2.3.4 Die Quervernetzung der Hydrogele mit PEG-SG reduziert die durch Fibroblasten vermittelte Kontraktion

Kollagenhydrogele mit humanen dermalen Fibroblasten wurden hergestellt, um die Fähigkeit der quervernetzten Kollagenhydrogele zu stärken und der zellvermittelten Kontraktion zu widerstehen. Dermale Fibroblasten kamen zur Anwendung, da sie stärker und schneller die Hydrogele kontrahieren als die stromalen Zellen. Die Beobachtung des Flächeninhaltes dauerte über 21 Tage. Nicht quervernetzte Kollagenhydrogele mit und ohne Fibroblasten dienten zur Kontrolle (Abbildung 14C). Während der Kulturdauer schrumpften die nicht quervernetzten Kollagenhydrogele auf $49,9 \pm 8,9$ % ihrer ursprünglichen Fläche. Im Gegensatz dazu wurde signifikant weniger Kontraktion gemessen bei den mit PEG-SG₅₀ und PEG-SG₁₀₀ behandelten Hydrogelen, die $99,2 \pm 3,1$ % und $99,0 \pm 1,8$ % ihrer Fläche behalten haben (Abbildung 14D)⁸⁸. Der Aufbau von quervernetzten Kollagenhydrogelen mit stromalen Zellen über 7 Tage zeigte ein ähnliches Bild mit homogen verteilten Zellen über das gesamte Hydrogel (Abbildung 14E, F).

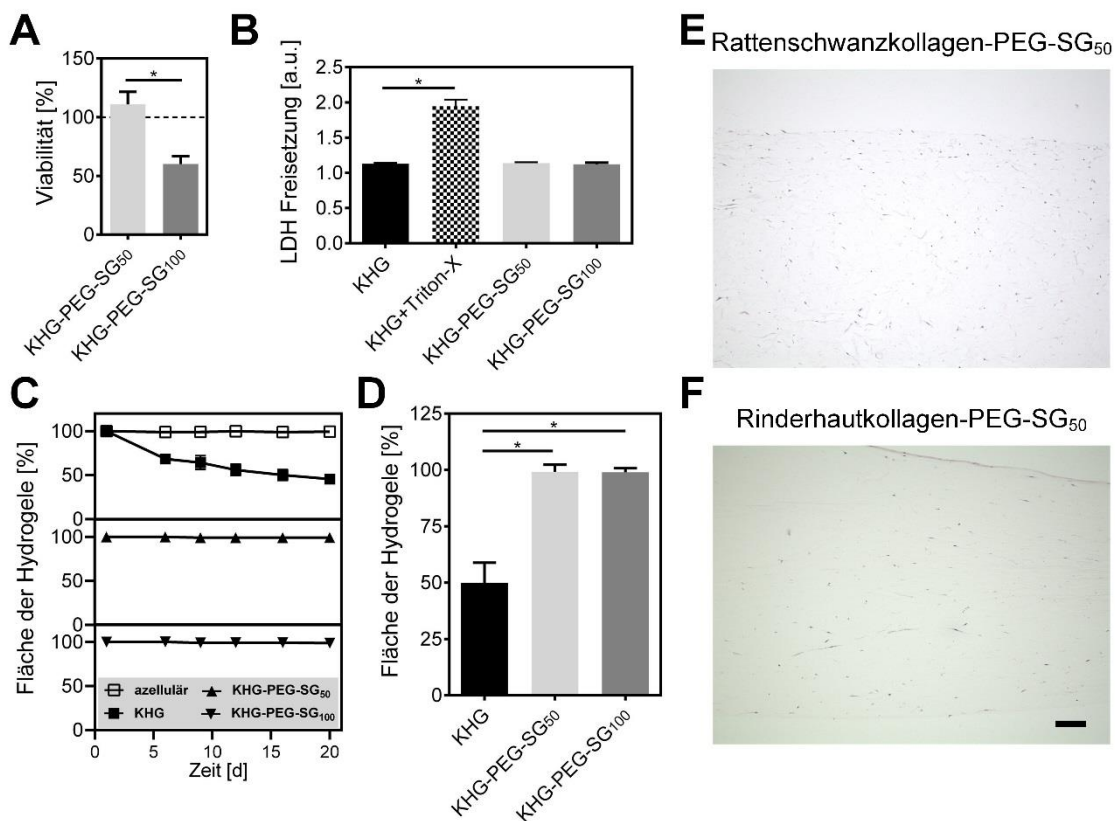


Abbildung 14: Biologische Begutachtung der PEG-SG quervernetzten Kollagenhydrogele. (A) Die Viabilität von primären humanen Fibroblasten wurde mittels MTT-Test mit PEG-SG₅₀ (KHG-PEG-SG₅₀) und PEG-SG₁₀₀ (KHG-PEG-SG₁₀₀) quervernetzten Hydrogelen nach 21 Tagen evaluiert. Die Werte wurden auf Fibroblasten in nicht quervernetztem Kollagenhydrogel normalisiert (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung; ***p < 0,001). (B) Die Laktatdehydrogenase-Freigabe (LDH) der Fibroblasten im PEG-SG-Kollagenhydrogel. Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde ein LDH-Assay durchgeführt mit nicht quervernetzten Kollagenhydrogelen (KHG), mit PEG-SG₅₀ (KHG-PEG-SG₅₀) und PEG-SG₁₀₀ (KHG-PEG-SG₁₀₀) quervernetzten Kollagenhydrogelen, deren humane dermale Fibroblasten für 24 Stunden kultiviert wurden. Als Positivkontrolle wurde ein Kollagenhydrogel mit humanen Fibroblasten 2 Stunden mit 1 % Triton X-100 behandelt (KHG+Triton X-100) (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung; **p < 0,01, ***p < 0,001). (C) Kontraktionsstudie der besiedelten quervernetzten Kollagenhydrogele. Die Kontraktion durch die humanen dermalen Fibroblasten des nicht quervernetzten Kollagenhydrogels, des mit PEG-SG₅₀ (KHG-PEG-SG₅₀) und PEG-SG₁₀₀ (KHG-PEG-SG₁₀₀) quervernetzten Kollagenhydrogels wurde 21 Tage über die Fläche der Gele bestimmt. Zur Kontrolle wurde ein zellfreies Kollagenhydrogel eingesetzt (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung). (D) Die Kontraktion der Kollagenhydrogele an Tag 21. Der verbleibende Flächeninhalt der besiedelten Kollagenhydrogele des nicht quervernetzten Kollagenhydrogels, des mit PEG-SG₅₀ (KHG-PEG-SG₅₀) und PEG-SG₁₀₀ (KHG-PEG-SG₁₀₀) quervernetzten Kollagenhydrogels wurde an 21 Tagen separat dargestellt (n=3; Mittelwert ± Standardabweichung; *p < 0,05). HE-Färbung der PEG-SG₅₀ quervernetzten Kollagenhydrogele mit primären humanen stromalen Zellen auf (E) Rattenschwanzkollagenbasis oder auf (F) Rinderkollagenbasis nach 7 Tagen Kultur. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

4.3 Die Herstellung von Cornea-Äquivalenten

Im letzten Schritt der Modellentwicklung sollten die cornealen Epithelzellen und das Stroma-Äquivalent mit stromalen Zellen kombiniert werden, um ein Hemi-Cornea-Modell oder ein Voll-Cornea-Äquivalent mit RPE-Zellen als Endothelersatz zu gewinnen. Das Hemi-Cornea-Modell setzt sich aus primären humanen Epithelzellen, die ein mehrschichtiges Epithel bildeten und stromalen Zellen vom selben Spender zusammen, die in quervernetztem oder nicht quervernetztem Kollagenhydrogel das Stroma-Äquivalent bildeten (Abbildung 15). Das mehrschichtige Epithel zeigt über das ganze Modell starke Verhornung. Die stromalen Zellen sind gleichmäßig über die Hydrogele verteilt. Das Epithel des mit PEG-SG₅₀ quervernetzten Kollagenhydrogels weist mehr Epithelschichten auf.

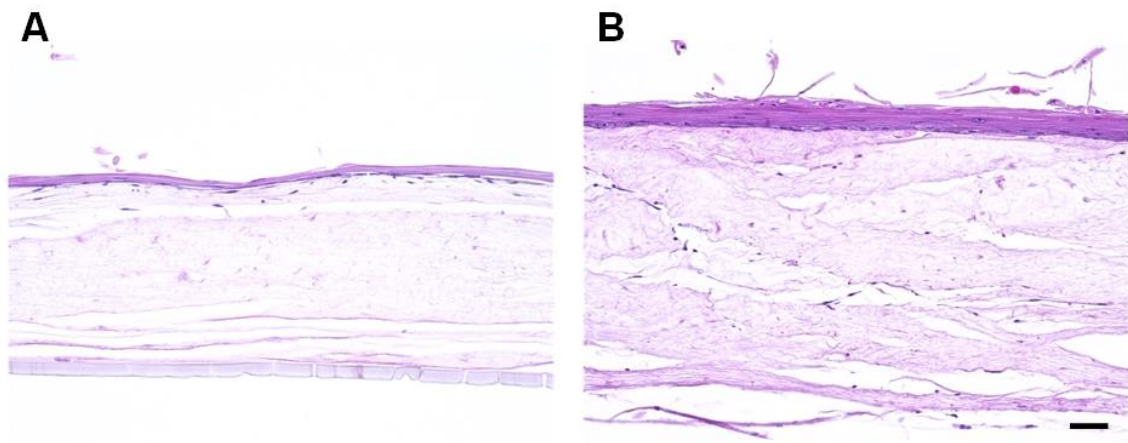


Abbildung 15: Das Hemi-Cornea-Modell. HE-Färbung des Hemi-Cornea-Modells nach Tag 11 an der Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche, das mit primären humanen Epithelzellen und stromalen Zellen desselben Spenders generiert wurde. Als Stroma-Äquivalent wurde (A) Kollagenhydrogel oder (B) mit PEG-SG₅₀ quervernetztes Kollagenhydrogel eingesetzt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Als Ersatz für die postmitotischen Endothelzellen fungierten RPE-Zellen zur Generierung des Voll-Cornea-Äquivalents. Das corneale Epithelium bildete zwei Schichten und die stromalen Zellen waren homogen über das Kollagenhydrogel verteilt (Abbildung 16). Die RPE-Zellen schlossen das Cornea-Äquivalent basolateral mit einem Monolayer ab (Abbildung 16C).

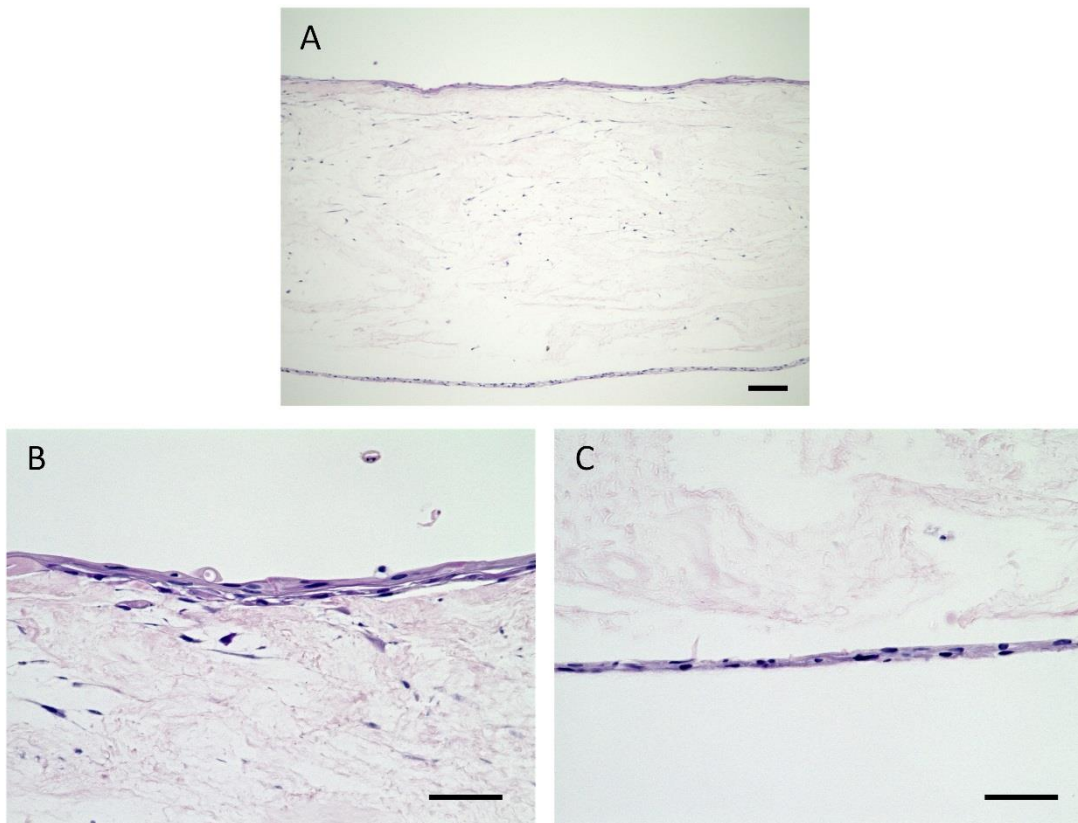


Abbildung 16: Das Voll-Cornea-Äquivalent. (A) HE-Färbung des Cornea-Äquivalents nach 11 Tagen Kultur an der Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . Das Modell wurde mit (B) humanen primären cornealen Epithelzellen, stromalen Zellen und (C) RPE-Zellen als Endothelersatz besiedelt. Als Matrix kam Rattenschwanzkollagen zum Einsatz. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

4.4 Die Impedanzspektroskopie als Analysemethode für in vitro-Testsysteme

Parallel zur Modellentwicklung für den Augenreizungstest konnte die Analysemethode zur Evaluation der Modelle verbessert werden. Durch den Einsatz der Impedanzspektroskopie konnte eine Frequenz für die TEER-Wertmessung definiert werden, die eine nicht-destruktive Messung des Zustands des Testsystems ermöglichte. Hierfür gelang zusätzlich die Entwicklung einer speziellen Messkammer, die die neue Messmethode schnell und einfach einsetzbar macht.

4.4.1 Der TEER-Wert bei 1000 Hz verbessert die Analysemethode für in vitro-Modelle

Um die Analyse für den Augenirritationstest zu verbessern, wurde die Gewebebarriere mithilfe der Impedanzspektroskopie untersucht. Durch die Impedanzspektroskopie-Messung über die Frequenz von 1 Hz-100 kHz konnte ein spezifischer Verlauf der Amplitude der Impedanz dargestellt werden (Abbildung 17). Der Kurvenverlauf veränderte sich je nach Gewebeart und Kulturzeit, sodass jedes Modell ein spezifisches Muster besonders

im Bereich von 1 Hz - 1 kHz im Gegensatz zum leeren Insert bildete. Für das RHE wies die Amplitude ein stabileres Plateau zwischen 10 Hz - 1 kHz auf, wohingegen die Amplitude des RCE und mRHE schneller abnahm. Da die Unterschiede zwischen den Modellen nur schlecht sichtbar waren bei 12,5 Hz, der Frequenz, bei der die Hand-Elektrode Millicell-ERS2 den TEER bestimmt, wurden für die Modelle dieser Studie 1000 Hz als Referenzfrequenz gewählt. Deswegen wurde ein neuer TEER-Wert definiert: der $TEER_{1000\text{ Hz}}$ [Ωcm^2] der Impedanzamplitude in Ω bei 1000 Hz multipliziert mit der Kulturfläche ($0,6\text{ cm}^2$).

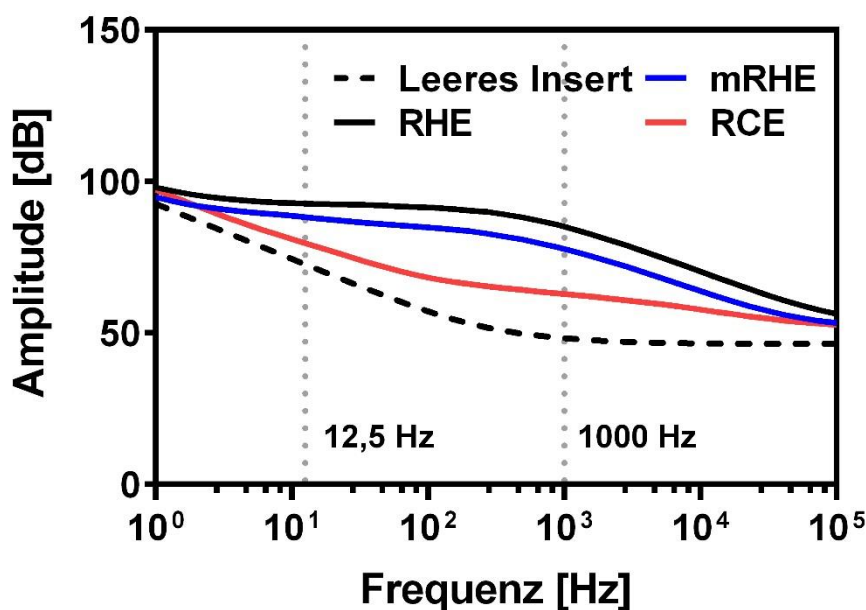


Abbildung 17: Impedanzspektroskopische Untersuchung der in vitro-Cornea-Modelle. Impedanzamplitude der rekonstruierten humanen Epidermis (RHE), der modifizierten rekonstruierten humanen Epidermis (mRHE) und das rekonstruierte humane corneale Epithelium (RCE) im Vergleich zu einem leeren Insert. Die gepunkteten Linien zeigen 12,5 Hz und 1000 Hz an.

4.4.2 Die Entwicklung einer 24-Well Impedanzspektroskopie-Messkammer

Die toxikologische Testung von neuen Substanzen ist ein regelmäßiger Prozess und beansprucht eine Vielzahl an Messungen zur Evaluation der potentiellen Gefahrstoffe. Deshalb wurde die Impedanzspektroskopie-Messkammer speziell für 24-Well-Multiterplatten mit BRAND- oder Millicell-Inserts entworfen, um 24 Modelle einfach und schnell in der gewohnten Laborumgebung messen zu können. Die Messkammer ersetzte den Deckel der Zellkulturplatte und gewährleistete somit eine sterile Umgebung für die Modelle. Dies erlaubte einen vergleichbaren Transport mit den normalen Zellkulturplatten. Nach der Messung konnte der ursprüngliche Deckel weiterverwendet werden. In den Deckel wurden 48 Elektroden aus rostfreiem Stahl eingelassen, um insgesamt 24 Inserts in einem Durchlauf messen zu können. Die Verbindung der Elektroden mit einem Sub-D-Stecker

ermöglichte eine Automatisierung der Messungen. Pro Multititerplatte wurden zwei Elektroden positioniert. Die Arbeitselektrode wurde durch eine Insertwand von der Referenzelektrode getrennt. Die Anfertigung der Messkammer aus Polyamid bewährte sich. Die Messkammer war einerseits biokompatibel und konnte andererseits zur Sterilisation autoklaviert werden (Abbildung 18).

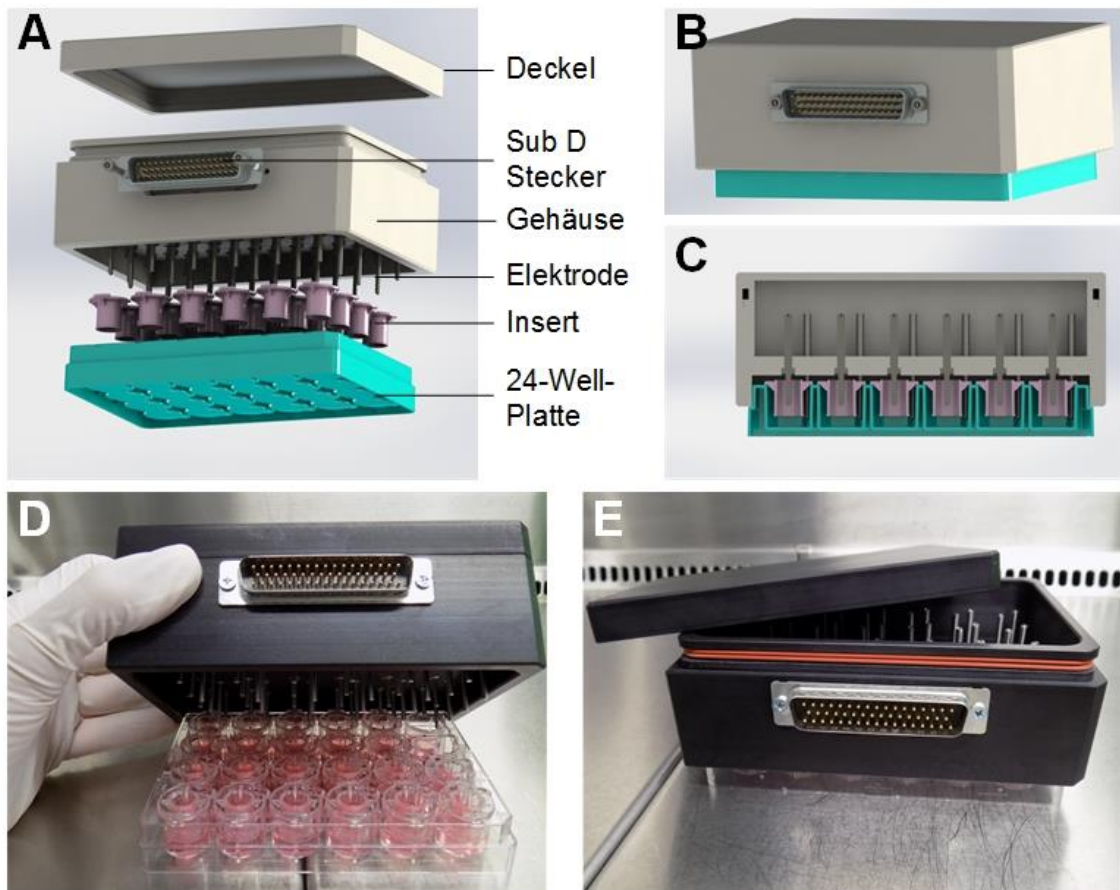


Abbildung 18: Impedanzspektroskopie-Messkammer. (A) Rechnerunterstützte Konstruktion (computer-aided design; CAD) der Messkammer mit Insert und 24-Well-Multititerplatte in der Explosionsdarstellung. CAD-Modell der (B) zusammengesetzten Kammer und (C) Längsschnitt durch die zusammengesetzte Kammer. Bild von der hergestellten Messkammer (D) in der Frontansicht und (E) von oben.

Alle Bauteile, die für die Konstruktion der Messkammer verwendet wurden, sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Liste der Impedanzspektroskopie-Messkammerbauteile.

Bauteil	Anzahl	Bemerkung
Gehäusedeckel	1	Polyamid
Gehäuseunterteil	1	Polyamid
Elektroden	48	rostfreier Stahl (V2A)
Sub-D-Stecker	1	50-polig
O-Ring	24	1 mm
O-Ring	2	3 mm
Schrauben	2	M3

4.4.3 Die Messgenauigkeit der Messplätze in der entwickelten Messkammer

Nach der Konstruktion der Messkammer wurde die Messgenauigkeit der verschiedenen Messplätze in der Messkammer evaluiert (Abbildung 19). Hierfür wurde ein Insert mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße an jedem Messplatz der Messkammer gemessen, um eine homogene Messung zwischen den Messplätzen zu gewährleisten. Der Verlauf der Amplitude der Impedanz und die Phase wurden in einem sogenannten Bode-Plot dargestellt. Der Unterschied zwischen den Messplätzen ist über alle Frequenzen hinweg in Amplitude und Phase vernachlässigbar für die Evaluierung von Cornea-Modellen. Die größte Standardabweichung betrug $0,7 \text{ dB}$ in der Amplitude bei 14 Hz . Mit höheren Frequenzen nimmt die Standardabweichung weiter ab. Die Varianz der Phase hatte ihr Maximum mit $1,9^\circ$ bei 272 Hz .

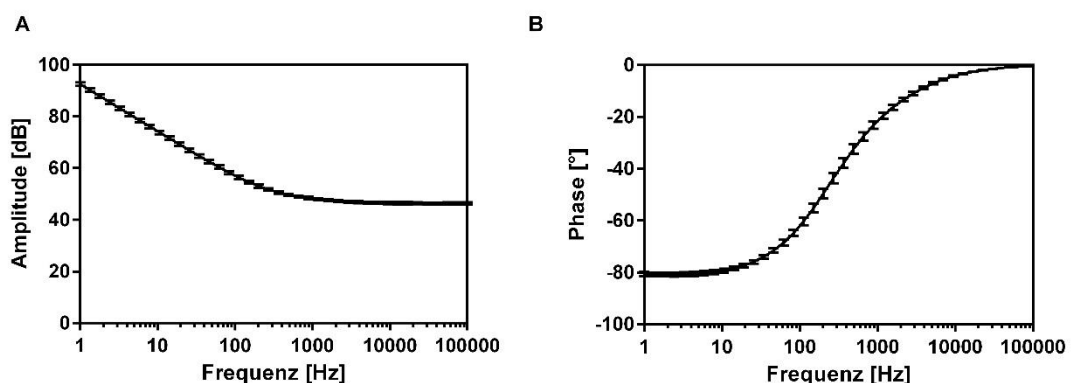


Abbildung 19: Messgenauigkeit der Messplätze in der Impedanzspektroskopie-Messkammer. Impedanzspektroskopie-Messung eines Inserts mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße von Millicell® an allen 24 Messplätzen (A) Amplitude und (B) Phase ($n=24$; Mittelwert \pm Standardabweichung).

4.5 Die Entwicklung eines Augenreizungstests zur Vorhersage aller GHS-Kategorien

In dem letzten Schritt wurden die hergestellten Modelle und die Impedanzmessung kombiniert, um einen Augenirritationstest zu entwickeln, der den Draize-Augenreizungstest ersetzt. Das Hemi-Cornea-Modell und das Cornea-Äquivalent wurden nicht getestet wegen der unzureichenden Epithelentwicklung.

4.5.1 Das RCE weist die beste Vorhersagekraft im MTT-basierten Augenreizungstest

Die Modelle und die TEER_{1000 Hz}-Messung wurden in das bestehende Protokoll der OECD TG 492 implementiert. Hierfür wurden die Modelle vor und nach der Applikation der neun Chemikalien, drei aus jeder GHS-Kategorie, mit der Impedanzspektroskopie gemessen (Tabelle 14, Abbildung 20). Citrat und Toluol wurden speziell ausgesucht, da diese nach den derzeitigen Tests nicht eindeutig zugeordnet werden können und somit neue Erkenntnisse über deren Klassifizierung zu gewinnen. Phosphatgepufferte Salzlösung diente als negative Kontrolle und 5 % Natriumlaurylsulfat als positive Kontrolle. Zur Unterscheidung nicht-irritativer und irritativer Substanzen wurde der publizierte Schwellenwert von 60 % übernommen⁸². Technische Duplikate wurden so verwendet, wie sie in der Validationsstudie für die Implementierung der TG 492 vorgeschrieben sind. Zusätzlich wurden drei unabhängige Testläufe mit den aus verschiedenen Spendern generierten Geweben durchgeführt, um die Robustheit des Verfahrens zu demonstrieren. Als erstes wurden die Modelle nach dem Standard-MTT-Test analysiert. Das RHE zeigte dabei höhere verbleibende Viabilitäten im Vergleich zu mRHE und RCE für Kategorie-1 und 2- Substanzen wie Natriumlaurylsulfat und Aceton. Das RHE wies eine hohe Reproduzierbarkeit auf, sowohl bei den technischen Replikaten als auch bei den verschiedenen Testläufen mit einer Ausnahme bei der Ethanol-Testung. Im Vergleich wiesen das RCE und mRHE eine höhere Schädigung nach Behandlung mit Kategorie 1 Substanzen auf. Im RCE waren die Effekte der irritativen Substanzen am stärksten ausgeprägt und ließen die beste Einteilung zu, da es eine deutliche Abstufung zwischen „keiner Kategorie“, Kategorie 1 und Kategorie 2 gab (Abbildung 20A, B). Das RCE lieferte für die technischen Replikate und die Testläufe gleiche Ergebnisse. Ausnahmen bildete nur eine spenderabhängige Abweichung bei Aceton und Ethanol. Die Problemsubstanzen Citrat und Toluol reduzierten die Viabilität in allen Modellen und Testläufen unter 60 % (Abbildung 20A). Zusammengefasst haben alle Modelle eine Spezifität von 66,7 % erreicht. Jedoch, hat das RHE die geringste Sensitivität mit 50 % und die geringste Genauigkeit mit 66,7 %. Die Vorhersagekraft des mRHE war besser – und zwar mit einer Sensitivität und Genauigkeit mit 66,7 %. Die besten Ergebnisse lieferte das RCE mit einer Sensitivität von 100 % und einer Genauigkeit von 88 % mit dem MTT-basierten Protokoll der OECD TG 492.

Durch das Zusammenfassen der Ergebnisse der Testsubstanzen in ihre GHS Kategorien konnte statisch gezeigt werden, inwieweit die Modelle die Kategorien unterscheiden können. Eine statistische Analyse wurde durchgeführt mit den kombinierten Ergebnissen aller Testsubstanzen einer Kategorie (Abbildung 20B). Für das RHE konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kategorien gefunden werden. Das mRHE und RCE waren im Gegensatz dazu in der Lage, „keine Kategorie“ und Kategorie 1 voneinander zu unterscheiden. Das RCE wies die größten Unterschiede zwischen irritativen und nicht-irritativen Substanzen auf.

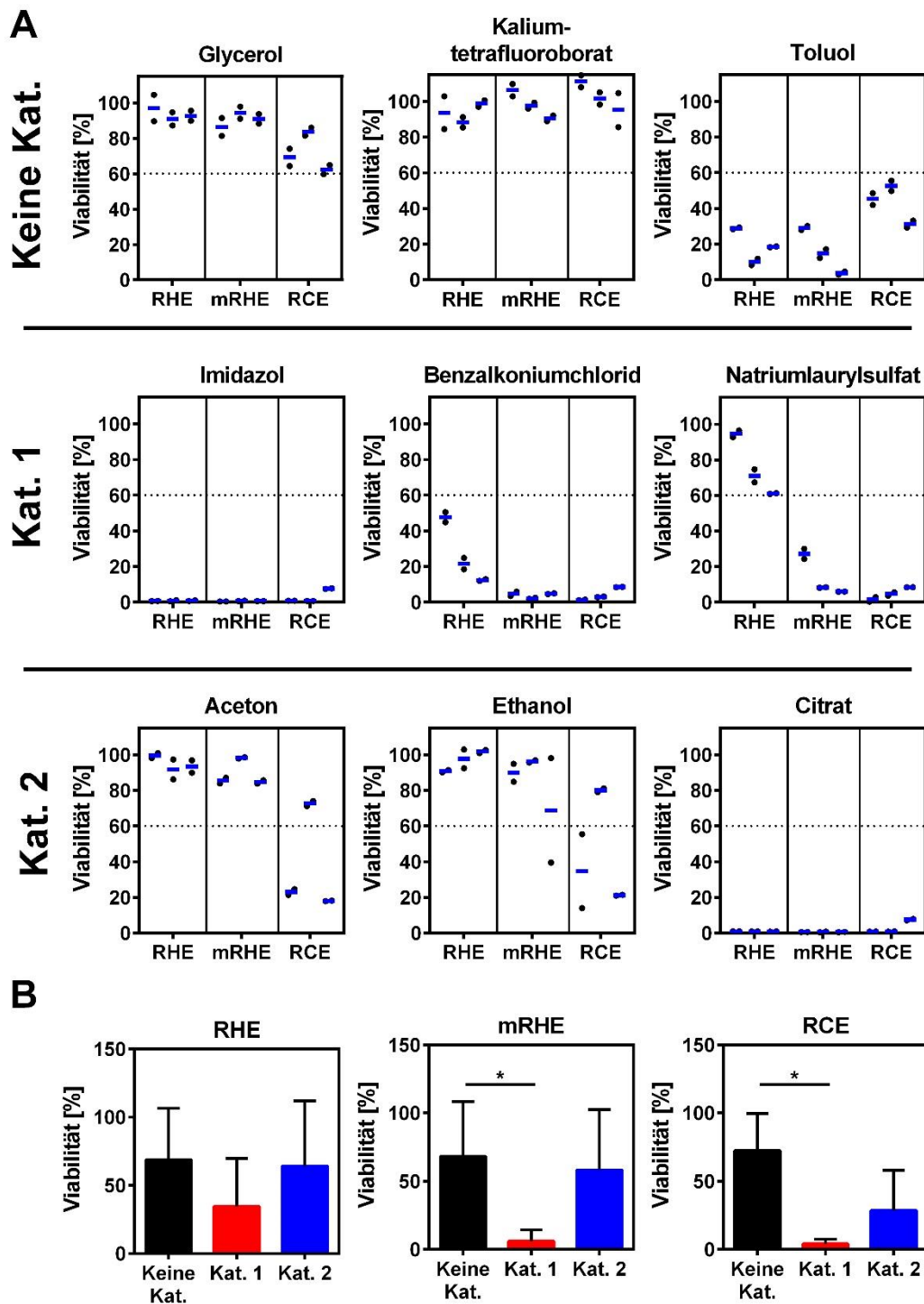


Abbildung 20: Augenreizungstest angelehnt an die OECD TG 492. Die rekonstruierte humane Epidermis (RHE), die modifizierte rekonstruierte humane Epidermis (mRHE) und das rekonstruierte humane corneale Epithelium (RCE) wurden nach der TG 492 mit dem MTT-Test gemessen. (A) Die Viabilität wurde auf die negative Kontrolle normalisiert. Drei verschiedene Testläufe mit zwei technischen Duplikaten wurden mit drei Testsubstanzen in allen drei GHS-Kategorien durchgeführt. (B) Zur Unterscheidung der GHS-Kategorie für den Endpunkt Augenirritation wurden die Testergebnisse der Chemikalien in ihre Kategorien zusammengefasst. Die Viabilität wurde auf die negative Kontrolle normalisiert ($n=9$; Mittelwert \pm Standardabweichung; $*p < 0,05$).

4.5.2 Die TEER_{1000 Hz}-Messung verbessert die Sensitivität des Testverfahrens mit RHE und mRHE

Die TEER-Messung erlaubt die Detektion von Unterschieden, die im MTT-Test nicht erkennbar waren (Abbildung 9). Zum Vergleich der verschiedenen Modelle, wurde der TEER_{1000 Hz} auf die negative Kontrolle normalisiert. Bei den nicht kennzeichnungspflichtigen Substanzen verzeichnet Kaliumtetrafluoroborat keine nennenswerte Veränderung nach Substanzapplikation und bleibt bei allen Tests um die 100%. Toluol weist - ähnlich wie im MTT-basierten Test - eine moderate Senkung des TEER_{1000 Hz} beim RHE auf 23 %, beim mRHE auf 54 % und beim RCE auf 67 %. Bei Glycerol fällt die Barriere im RHE stark auf 29 % und im mRHE leicht auf 61 % ab, während sie beim RCE mit 98 % hoch bleibt. Des Weiteren reduzieren die Kategorie 1-Substanzen Imidazol, Benzalkoniumchlorid und Natriumlaurylsulfat die Barriere unter 20 % des intakten Gewebes des RHE und mRHE. Die Kategorie 2-Substanzen Ethanol und Aceton erzielten noch zwischen 20 % und 50 % der Barriere. Citrat fiel hingegen auf ähnliche Werte wie die Kategorie 1-Substanzen ab. Die RCE-Werte waren über die Tests hinweg hoch und wiesen nur kleine Unterschiede zwischen den Chemikalien der drei Kategorien auf (Abbildung 21A).

Um die Frage zu beantworten, ob der TEER_{1000 Hz} zwischen den verschiedenen GHS-Kategorien unterscheiden kann, wurden im Folgenden die Ergebnisse aller Kategorien zusammengefasst. Durch den Einsatz der TEER_{1000 Hz}-Messung erhöhte sich die Vorhersagekraft des mRHE und RHE. Beim RCE konnte jedoch keine weitere Verbesserung in Bezug auf das MTT-basierte Protokoll nachgewiesen werden. Das RHE in Kombination mit der TEER_{1000 Hz}-Messung war nun in der Lage, Unterschiede zwischen „keine Kategorie“ und von Kategorie 1-Substanzen zu identifizieren. Das mRHE konnte in dieser Kombination „keine Kategorie“ von Kategorie 1 und „keine Kategorie“ von Kategorie 2 unterscheiden, was demzufolge eine Unterscheidung zwischen reizenden und nichtreizenden Substanzen erlaubt. (Abbildung 21B).

Obwohl mit der Impedanzmessung so eine Unterscheidung zwischen irritativen und nicht-irritativen Substanzen möglich ist, fehlt immer noch die benötigte Unterscheidung zwischen den reizenden Substanzen der Kategorie 2 und den schwer schädigenden der Kategorie 1. Deshalb sollten im nächsten Schritt wiederholte TEER-Messungen über 11 Tage durchgeführt werden, um Informationen über die Persistenz der irritativen Effekte zu erhalten.

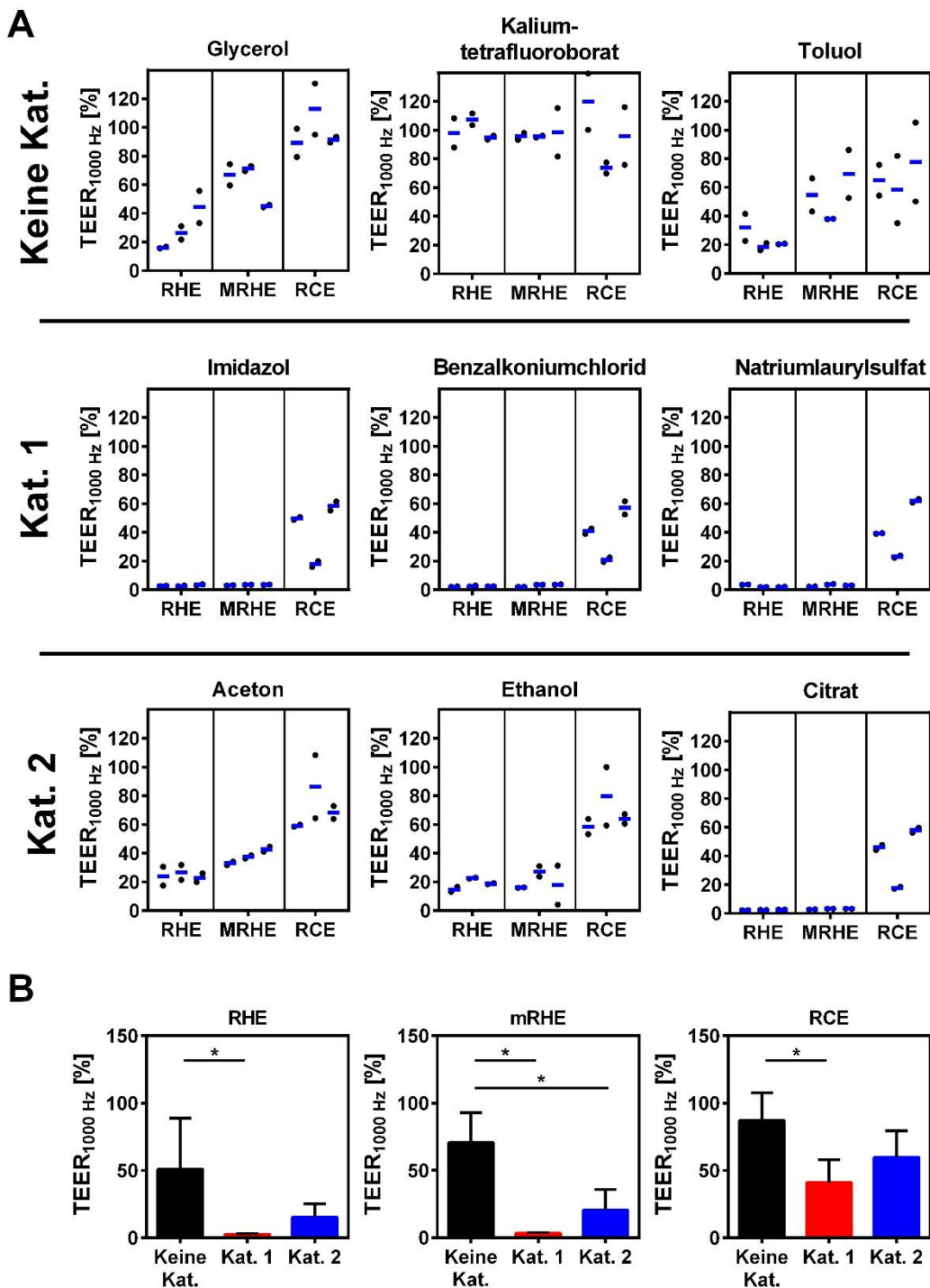


Abbildung 21: Augenreizungstest mithilfe der TEER_{1000 Hz}-Messung. Die rekonstruierte humane Epidermis (RHE), die modifizierte rekonstruierte humane Epidermis (mRHE) und das rekonstruierte humane corneale Epithelium (RCE) wurden mit TEER_{1000 Hz} gemessen. (A) Der TEER_{1000 Hz} wurde normalisiert auf die negative Kontrolle. Drei verschiedene Testläufe mit zwei technischen Duplikaten wurden mit drei Testsubstanzen in den drei GHS-Kategorien durchgeführt. (B) Zur Unterscheidung der GHS-Kategorie für den Endpunkt Augenirritation wurden die Testergebnisse der Chemikalien in ihre Kategorien zusammengefasst. Der TEER_{1000 Hz} wurde auf die negative Kontrolle normalisiert (n=9; Mittelwert ± Standardabweichung; *p < 0,05).

4.5.3 Wiederholte TEER_{1000 Hz}-Messungen erlauben eine Unterscheidung zwischen den GHS-Kategorien

Zur Klarstellung, ob ein Effekt reversibel ist, wurde der TEER_{1000 Hz} vor der Applikation der Testsubstanz, direkt danach und an den Tagen 1, 3, 7 und 11 nach der Substanzapplikation gemessen (Abbildung 22). Aufgrund der hohen Vorhersagekraft des TEER_{1000 Hz}-basierten Protokolls und der Spendervariation beim RCE wurde das mRHE als das am besten geeignete Modell für die wiederholten TEER-Messungen ausgewählt. Von den nicht kennzeichnungspflichtigen Substanzen wies Glycerol einen initialen Abstieg zwischen 29 % und 66 % auf, erholte sich aber wieder über die folgenden 11 Tage und erzielte einen Wert über 100 %. Der TEER_{1000 Hz} von Natriumtetrafluorborat behielt einen Wert von um die 100 % im Vergleich zur negativen Kontrolle über die gesamte gemessene Zeit bei. Für Toluol als nicht-harmonisierte Substanz, fiel der Wert initial nur geringfügig ab, persistierte aber und nahm dann kontinuierlich mit der Zeit auf Werte unter 50 % weiter ab. Die Kategorie 1 Substanzen fielen im Gegensatz dazu alle unter 6 % nach der Substanzapplikation und erholten sich nicht mehr. Die TEER_{1000 Hz}-Messung der Kategorie 2-Substanzen fiel mit Ausnahme von Citrat zunächst unter 50 % nach der Substanzapplikation ab, regenerierte sich aber wieder über die Zeit mit Werten von über 50 % an Tag 11 (Abbildung 22A). Interessanterweise war der Verlauf von Citrat gleich dem der Kategorie 1-Substanzen und fiel initial auf unter 8 % ab und wies keine Zeichen der Erholung auf.

Die statistische Analyse an jedem Messzeitpunkt sollte verifizieren, dass die wiederholte TEER_{1000 Hz}-Messung in dem mRHE-Modell für die Unterscheidung aller GHS-Kategorien bei Augenreizung eingesetzt werden kann (Abbildung 22B). Vor der Substanzapplikation bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Modellen. Direkt nach der Substanzapplikation konnte eine Kategorie gegen Kategorie 1 und „keine Kategorie“ gegen Kategorie 2 unterschieden werden. Nach 1-3 Tagen war es möglich, signifikante Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Kategorien durch die TEER_{1000 Hz}-Messung eindeutig zu detektieren. Nach 7 Tagen erreichten alle Modelle, die mit nicht kennzeichnungspflichtigen oder Kategorie 2-Substanzen behandelt wurden, eine vergleichbare Gewebeintegrität und wiesen zugleich keine signifikanten Unterschiede zueinander auf. Der signifikante Unterschied zu Kategorie 1-Substanzen blieb hingegen bestehen (Abbildung 22B).

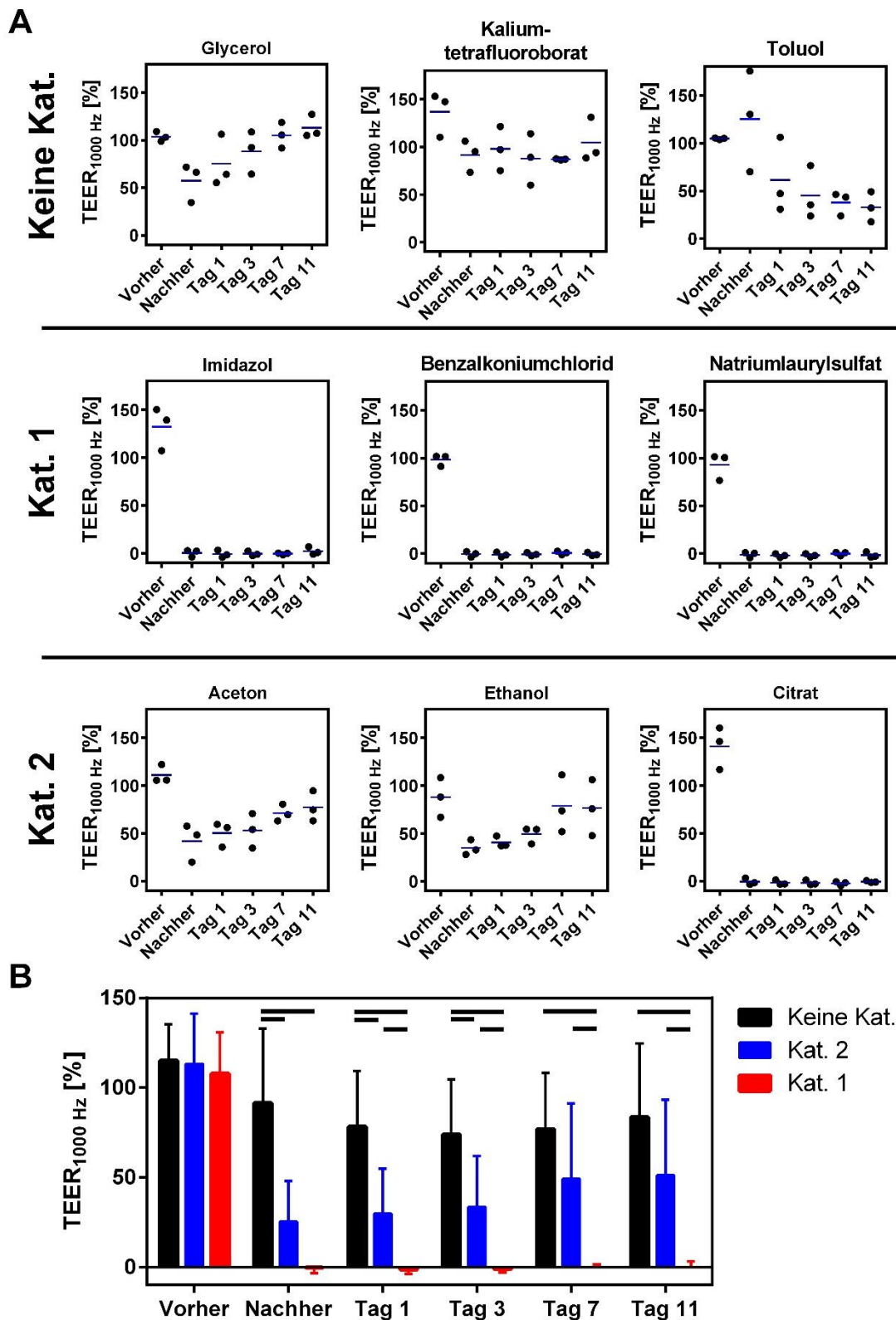


Abbildung 22: Wiederholte $TEER_{1000\text{ Hz}}$ -Messungen im mRHE-Modell zur Unterscheidung der GHS-Kategorien für Augenirritation. (A) Augenreizungstest mit wiederholten $TEER_{1000\text{ Hz}}$ -Messung normalisiert auf die Negativkontrolle während des 11 Tage Zeitraums ($n=3$; Mittelwert \pm Standardabweichung; $p < 0,05$). (B) Um die Fähigkeit des Testsystems zu verifizieren, zwischen den verschiedenen Augenirritationskategorien unterscheiden zu können, wurden die Testergebnisse der Chemikalien einer GHS-Kategorie zusammengefasst. Der $TEER_{1000\text{ Hz}}$ wurde auf die negative Kontrolle normalisiert ($n=9$; Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$).

5 Diskussion

Tissue Engineering wurde ursprünglich aus der Idee geboren, kranke Organe zu ersetzen. Nachdem die ersten funktionalen Gewebeäquivalente hergestellt werden konnten, wurde das Potential auch für die präklinische Forschung und Toxizitätstestung erkannt und genutzt. Mit diesen Modellen wurden neue standardisierte Testmethoden entwickelt, die eine ausreichende Vorhersagekraft erreicht haben, um Teil von international anerkannten OECD Richtlinien zu werden^{34,53,81,82}. Trotz der Fortschritte müssen jedoch immer noch tierbasierte Testmethoden für toxikologische Endpunkte eingesetzt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. So wurden bisher nur die zwei Endpunkte Hautirritation und Hautkorrosion der 14 toxikologischen Endpunkte komplett durch eine Alternative zum Tierversuch ersetzt. Der Endpunkt Augenirritation wird immer noch an lebenden Kaninchen nach dem Draize-Augenreizungstest durchgeführt. Jedoch führte die Entwicklung eines sich dem Tissue Engineering verdankenden Cornea Modells zu der neuen OECD TG 492. Diese kann zwischen reizenden und nicht-reizenden Substanzen unterscheiden, dennoch existierte damit noch kein alleinstehender Test, der den Draize-Augenreizungstest komplett ersetzt. Ein Grund ist die komplexere Klassifizierung für den Endpunkt Augenirritation im Gegensatz zum Endpunkt der Hautirritation. Eine einfache Ja/ Nein-Antwort reicht nicht aus, da Substanzen auch hinsichtlich der Reversibilität ihrer Effekte kategorisiert werden. Hinzu kommt, dass corneales Gewebe als Zellquelle für den Aufbau von Gewebemodellen nur schwer erhältlich ist⁹⁹. Das ist ein Grund, warum alternative Zellquellen wie primäre Hautkeratinozyten, Stammzellen und immortalisierte Zelllinien eingesetzt wurden, um corneale Modelle zu produzieren^{66,82}. Der Einfluss dieser Zelltypen auf die toxikologische Bewertung wurde jedoch noch nicht systematisch untersucht.

5.1 Der Zellursprung definiert das Cornea-Modell

Die immer wiederkehrende Frage bei Prädiktionsmodellen ist, wie einfach kann das Testsystem sein und trotzdem zuverlässig in der Lage sein, eine wissenschaftlich ausreichende Vorhersage zu gewährleisten. Im Fall der *in vitro*-Modelle für die Evaluation des Augenreizungspotentials können Epithelmodelle die erste anatomische Barriere des Auges nachahmen. Deshalb liefern sie entscheidende Informationen über die initiale Reaktion. Aufgrund der zuerst entwickelten Hautmodelle war der Einsatz von Hautkeratinozyten erprobt und wurde auch für die Generierung von den anatomisch ähnlichen Cornea-Modelle verwendet. Durch den Weiteren Fortschritt in der Forschung ergab sich die Frage, ob es ausreicht, Hautkeratinozyten zur Herstellung von Cornea-ähnlichen-Modellen einzusetzen oder ob die Hauptzelltypen: Epithel-, Stroma- und Endothelzellen der Cornea selbst notwendig sind¹⁰⁰⁻¹⁰².

Die cornealen Epithel- und Stromazellen konnten *in vitro* expandiert werden und erhielten ihre gewebespezifischen Marker wie Zytokeratin 3/12 und Aldehyddehydrogenase 3A1, die nicht in epidermalen Zellen vorkommen^{92,103}. Die Endothelzellen können zwar isoliert werden, sind aber post-mitotisch und proliferieren nicht mehr (Abbildung 7). Es existieren Protokolle, um die Endothelzellen zu kultivieren und expandieren, jedoch zeigen auch diese nur mäßigen Erfolg¹⁰⁰. Zusammengefasst ist zu konstatieren, dass die Gewinnung von humanem cornealen Gewebe für die Isolation von Zellen eine größere Herausforderung darstellt als zum Beispiel die der Haut⁹⁹. Dieses Hindernis müsste berücksichtigt und adressiert werden, wenn Modelle aus cornealen Zellen in Massen wie in der toxikologischen Risikobewertung eingesetzt werden sollen. Nichtsdestotrotz bedeutet die Möglichkeit, corneazell-basierte Modelle herzustellen, nicht nur eine Verbesserung für die okuläre Toxikologie, sondern auch insbesondere für die okuläre Pharmakologie, bei der die Expression von gewebespezifischen Proteinen eine Schlüsselrolle spielt.

Die vollständige Ersetzung des Draize-Augenreizungstests erforderte im Gegenzug die wissenschaftliche Verifikation der Hypothese, dass die Kombination eines cornealen *in vitro*-Modells mit einer nicht destruktiven Messmethode in der Lage ist, alle GHS-Kategorien in Bezug auf die Verursachung von Augenirritation zu erkennen. Deswegen wurden in dieser Studie corneale Epithelmodelle aus primären humanen cornealen oder epidermalen Epithelzellen hergestellt und bezüglich der Morphologie und der Lokalisierung der gewebsspezifischen Marker miteinander verglichen. Hierbei wurden abgesehen von den Zellen die Modelle mit den gleichen externen Bedingungen generiert. Einer der essentiellen Unterschiede zwischen Cornea und Haut ist die Verhornung des Epithels. Die Keratinozyten der Haut lagern während ihres Differenzierungsprozesses Keratin und Lamellenkörperchen ein, verlieren ihren Zellkern und werden zu Korneozyten die das stratum corneum bilden. Diese Hornschicht dient als dichte Barriere und schützt den menschlichen Körper vor physischen, chemischen und biologischen Gefahren. Im Gegensatz dazu muss die Cornea transparent sein, damit das Licht die sensorischen Zellen der Retina erreichen kann, das heißt sie weist faktisch keine verhornten Schichten auf. Ohne diese besondere physische Barriere ist die Cornea verletzlicher. Um also die *in vivo*-Situation widerzuspiegeln, sollte das Modellsystem keine verhornten Schichten aufweisen, die die Sensitivität verringern würden¹⁰⁴.

Corneale und epidermale Zellen konnten verwendet werden, um mehrlagige Epithelmodelle herzustellen. Die Modelle aus epidermalen Zellen rekapitulieren die native Anatomie der Haut und ihrer bestimmten Schichten mit Verhornung. Die auf cornealen Epithelzellen basierenden Modelle bilden weniger Zelllagen aus vergleichbar mit Epithel der nativen Cornea. Diese Beobachtung wurde durch eine geringere Widerstandsfähigkeit gegen Triton-X im ET₅₀ gemessen und durch den TEER_{1000 Hz} bestätigt. Dessen ungeachtet,

verhornten die Corneazellen trotz ihrer Herkunft nach 14 Tagen im epidermalen Kulturmedium (Abbildung 8). Die Epidermis und das corneale Epithelium sind durch ihren Ursprung im Ektoderm nah miteinander verwandt und es konnte gezeigt werden, dass corneale Epithelzellen in epidermale Zellen transdifferenzieren können und umgekehrt^{104,105}. Für beide Modelle wurde das gleiche epidermale Kulturmedium verwendet, das zur Verhornung der cornealen Zellen beigetragen haben könnte. Durch die Verkürzung der Kulturzeit der *in vitro*-Modelle aus epidermalen (mRHE) und cornealen Zellen (RCE) auf 11 Tage konnten die Modelle für Testungen eingesetzt werden, bevor die verhornten Schichten sich bildeten und eine Anatomie ähnlich der nativen Cornea generieren. Des Weiteren wiesen das RCE und mRHE eine niedrigere Barriere auf als das RHE - wie in der *in vivo*-Situation zu erwarten. Deswegen scheinen beide Zellquellen geeignet, um daraus Modelle für die Augenirritationstestung herzustellen. Diese enge Verwandtschaft der Zellen wurde zudem dafür genutzt, das EpiOcular® Cornea Epithelmodell basierend auf Hautkeratinozyten erfolgreich zu validieren⁸². Trotzdem existieren neben den anatomischen Gemeinsamkeiten auch signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen Cornea und Haut¹⁰⁶. In der Haut durchlaufen die Keratinozyten einen eng kontrollierten Prozess der terminalen Differenzierung, bei dem die metabolische Aktivität abnimmt und im geplanten Tod der Zellen endet. Während dieses Prozesses verändert sich das Zytokeratin-Netzwerk mit Zytokeratin 14 und 5 der Basalschicht hin zu Zytokeratin 10 und 1 in den suprabasalen Schichten. Involucrin, ein Substrat der Transglutaminase, ist in den oberen Schichten exprimiert und Loricrin im stratum corneum⁹⁶. Obwohl die Cornea ein ähnliches Zytokeratin 14-Muster zeigt, weist sie ein anderes Zytokeratin-Netzwerk mit Zytokeratin 3 und 12 in allen Zelllagen auf¹⁰⁷. Zusätzlich wurde Loricrin in allen Schichten des cornealen Epitheliums gefunden, was darauf hinweist, dass Loricrin hier eine andere Funktion als in der Epidermis hat¹⁰⁸. Loricrin stabilisiert durch die Assoziation mit Keratinen und Involucrin in verhornten Geweben wie der Haut den „Cornified Envelope“. Dies erklärt auch das gehäufte Auftreten des Proteins in den oberen Schichten der auf Hautzellen basierten Modelle. Im cornealen Epithel ist die Funktion noch nicht endgültig geklärt. So gibt es Hinweise das Loricrin durch die Assoziation mit Nektin vor mechanischem Stress schützt oder eine völlig andere Rolle als Signalmolekül spielt^{95,109}. Nichtsdestotrotz zeigt dieses Beispiel, dass selbst die gleichen Proteine unterschiedliche Funktionen aufgrund der Zellherkunft haben können, welche sich auf die Testergebnisse auswirken könnten. Die grundlegenden Anatomien des RCE und mRHE waren vergleichbar, aber die gewebsspezifischen Marker des Modells aus epidermalen Zellen entsprachen immer noch der Haut. Genauso wies das RCE aus cornealen Zellen dasselbe Proteinmuster und dieselben gewebespezifischen Marker wie die native Cornea auf. Dies ist besonders bemerkenswert, da trotz des epithelialen Mediums die eigentliche Proteinexpression beibehalten wurde (Abbildung 8 und Abbildung 9).

Durch die Anpassung des Kulturmediums mit weniger Calcium oder Zugabe von Retinsäure konnte die Verhornung verringert werden. Die Senkung des Calciumspiegels wirkte sich aber auch negativ auf die Entwicklung der Zellschichten aus. Es ist bekannt, dass der Calciumgradient ein wichtiger Regulator der Stratifizierung in der Haut ist. So wurde gezeigt, dass Calcium die Exocytose von Lamellekörperchen und die Formung des „cornified envelope“ über den Calciumsensitiven Rezeptor reguliert^{110,111}. Zugleich ist Calcium essentiell für viele Signalvorgänge in den Zellen darunter auch die für Proliferation und Differenzierung durch die Aktivierung der Phospholipase C^{112,113}. Das würde erklären, weshalb ein zu niedriger Calciumspiegel sich negativ auf die Zellen auswirkt^{113,114}. Die Retinsäure hat darüber hinaus auch zu einer Reduktion von Loricrin und hautspezifischen Markern wie Zytokeratin 1 geführt und bestätigt somit die vorangegangenen Studien, dass Retinsäure Loricrin und Zytokeratin 1 unterdrücken kann (Abbildung 10)^{115,116}. Diese Beobachtung kombiniert mit dem Wissen, dass die verschiedenen Zelltypen transdifferenziert werden können, birgt das Potential, ein Medium zu entwickeln, mit dem man epidermale Epithelzellen in corneale Epithelzellen differenzieren kann und folglich nicht auf primäre corneale Zellen angewiesen wäre.

Um die Hypothese zu prüfen, ob die anatomischen und molekularen Unterschiede zwischen RCE, mRHE und RHE sich auf die Barriereigenschaften auswirken, wurde ein ET₅₀-Assay durchgeführt. Wie erwartet, konnte das verhornte RHE viel länger einer schädigenden Substanz widerstehen als die nichtverhornten RCE und mRHE, da das Triton X-100 direkt mit den lebenden Zellen interagieren kann und nicht die physische Barriere des stratums corneum überwinden muss. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen RCE und mRHE im ET₅₀-Wert der metabolisch aktiven Zellen festgestellt werden, was eine ähnliche Barrierefunktion vermuten lässt. Mit der Impedanzspektroskopie konnte jedoch eine signifikante Differenz gefunden werden. Die Impedanzspektroskopie misst den komplexen wechselnden Stromwiderstand über einen definierten Frequenzbereich. Sie wurde als hochempfindliche Methode eingesetzt, um den Einfluss von Testsubstanzen auf die Barrierefunktion von Gewebemodellen zu evaluieren⁸⁵. Mit dieser Methode erreichte das RCE einen TEER_{1000 Hz} von nur 684 Ωcm², was signifikant niedrigere Werte im Vergleich zum mRHE mit 3718 Ωcm² und dem RHE mit 8726 Ωcm² bedeutete. Insofern deuten diese Daten darauf hin, dass ein erheblicher Unterschied zwischen den Markerexpressionen und den Barrierefunktionen der in vitro-Modelle aus epidermalen oder cornealen Zellen besteht. Dass dieser Unterschied von den Zellen selbst ausgeht, wird durch den Einsatz desselben Kulturmediums noch verstärkt.

5.2 Die Herausforderungen eines Cornea-Äquivalents

Das corneale Epithelium ist nur eines der drei Hauptanteile der Cornea. Den größten Part stellt das transparente Stroma dar, das hauptsächlich aus Kollagen und Stromal Zellen

besteht. Maurer und Jester waren unter den ersten Forschern, die die Wichtigkeit des Stromas für die Augenirritation hervorgehoben haben, indem sie bewiesen, dass die Tiefe der Verletzung mit dem Gefahrenpotential der Chemikalie zusammenhängt⁸. Des Weiteren trägt das Stroma den Hauptanteil an der Licht-Brechungskraft des menschlichen Auges und es muss unbedingt völlig klar sein, um das Sehen zu gewährleisten. Das ist auch ein Grund dafür, warum das Stroma im Mittelpunkt vieler ophthalmologischer Operationen steht, um den Visus der Patienten, die eine trübe Cornea haben, wiederherzustellen. Letzten Endes ist es erstrebenswert, ein Stroma-Äquivalent zur Rekonstruktion der gesamten Cornea als Transplantatersatz und für in vitro-Tests herzustellen. Drei verschiedene Ansätze wurden zur Generation eines Stroma-Äquivalents evaluiert: Selbstsynthese durch stromale Zellen, Kollagenhydrogele und quervernetzte Kollagenhydrogele.

Das Stroma ist ein hochorganisiertes Netz aus Kollagenfibrillen, die parallel und orthogonal zueinander angeordnet sind. Diese spezielle Struktur gewährleistet besondere Eigenschaften wie Transparenz, Brechkraft und die mechanische Stabilität des Stromas¹¹⁷. Deshalb wurde als erstes untersucht, ob die stromalen Zellen und dermalen Fibroblasten selbst ein organisiertes Stroma aufbauen können. Es ist bekannt, dass stromale Zellen und dermale Fibroblasten Kollagen in vitro produzieren können¹¹⁸. Beide Zelltypen konnten zur Kollagenproduktion angeregt werden, jedoch nicht derart, dass ein vollständiges etwa 500 µm dickes Stroma generiert worden wäre. Insbesondere die stromalen Zellen, die in der nativen Cornea hauptsächlich ruhen, produzierten wenig Matrix¹¹⁸. Selbst bei Verlängerung der Zeiträume und der Zugabe von Ascorbinsäure konnte die Kollagensynthese der Zellen nicht verbessert werden (Abbildung 11). Ein weiterer Versuchsansatz, dieses Problem zu lösen, könnte darin bestehen, die dünnen Schichten zu stapeln, um ein Stroma zu generieren. Mithilfe einer strukturierten Oberfläche könnten die Kollagenfibrillen in ihrer weiteren Organisation unterstützt werden.

Um ausreichend Kollagen zu erhalten, sollte fremdes Kollagen hinzugefügt werden, das die stromalen Zellen modellieren können. Die biotechnologische Herstellung von humanem Kollagen ist für Forscher allerdings immer noch eine große Herausforderung, weshalb in den meisten Fällen Kollagen aus Rattenschwänzen oder Rinderhaut gewonnen wird¹¹⁹. Auch für dieses wissenschaftliche Projekt wurde Rattenschwanz- und Rinderhautkollagen mit stromalen Zellen gemischt, um stromale Äquivalente zu generieren. Hierfür wurden die stromalen Zellen in Gelneutralisationslösung aufgenommen und mit dem gelösten Kollagen gemischt, sodass die Zellen während des Gelierungsprozess gleichmäßig im Kollagengel verteilt waren. Die stromalen Zellen hatten sich in das Hydrogel integriert und proliferiert. Die Proliferation erreichte eine Sättigung um die $5,5 \cdot 10^6$ Zellen pro Volumen oder $9,7 \cdot 10^4$ Zellen pro mm^3 , was ungefähr dreimal mehr Zellen entspricht als in der nativen Cornea beschrieben (Abbildung 12)¹²⁰. Diese erhöhte Zahl an Zellen lässt sich mit großer Sicherheit auf die Wachstumsfaktoren im Kulturmedium zurückführen, die die Proliferation der Zellen anregen. Die Verteilung der Zellen

war dennoch vergleichbar zur nativen Cornea. Nach 15 Tagen begann das Kollagenhydrogel zu kontrahieren, was auf ein Umgestalten des Kollagens hindeutet. Die Kontraktion fiel geringer aus und setzte später ein als bei dermalen Fibroblasten (Abbildung 13). Die in diesem Kontext gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Theorie, dass stromale Zellen hauptsächlich in ruhendem Zustand in der Cornea existieren und nur nach Aktivierung wie zum Beispiel durch eine Verletzung bei der Interleukine aus dem Epithel freigesetzt werden, ein Umgestalten des Stromas aktiv durchführen¹²¹.

Ein anderer Nachteil der Kollagenhydrogele zeigte sich darin, dass sie trüb und weniger stabil als die native Cornea waren aufgrund der zufälligen Anordnung der Kollagenfibrillen. Zur Verbesserung des Kollagenhydrogels hinsichtlich seiner mechanischen Stabilität und Klarheit kann die plastische Kompression oder chemische Quervernetzung zur Anwendung kommen^{122,123}. Beide Verfahren haben ihre eigenen Vor- und Nachteile. So erhält die plastische Kompression die Ultrastruktur des Kollagens, verbessert die mechanischen Eigenschaften, wirkt der Fibroblasten-vermittelten Kontraktion entgegen und generiert durch die Kompression eine ähnliche Dichte an Kollagen wie in vivo. Nichtsdestotrotz bleiben die Kollagenfibrillen bei dieser Methode ungeordnet wie im Bindegewebe, was nur eine geringe Transparenz zulässt. Die chemische Quervernetzung kann hingegen die Transparenz und die mechanische Stabilität zugleich erhöhen. Das Einbringen von Fremdmolekülen in das Stroma birgt jedoch das Risiko von anderen Nebeneffekten, wie die Veränderung der Ultrastruktur des Kollagens.

Deshalb existiert bis heute noch keine optimale Strategie zur Imitation der komplexen Eigenschaften des cornealen Stromas und somit gibt es auch keinen Ersatz für corneale Modelle, um toxikologische oder präklinische Testungen durchzuführen oder Implantate herzustellen. Da Kollagen den Hauptbestandteil des Stromas ausmacht und bemerkenswerte mechanische und biologische Eigenschaften besitzt, zählt es zu den vielversprechenden Materialien für das Tissue Engineering. Jedoch stellt die Etablierung eines Stromäquivalents für corneale in vitro-Testsysteme oder Implantate eine erhebliche Herausforderung dar aufgrund der spezifischen Anordnung der Kollagenfibrillen³². Um das Kollagenetzwerk zu stabilisieren, können molekulare Verbindungen zwischen den Fibrillen mit verschiedenen Quervernetzern eingebracht werden. Dieser wissenschaftliche Ansatz versucht die Stabilität und die mechanischen Eigenschaften des Kollagenhydrogels mit dem nicht toxischen Quervernetzer PEG-SG herzustellen, um negative Effekte auf die Zellviabilität zu vermeiden. Die N-Hydroxysuccinimid-Estergruppe des PEG-SGs kann mit freien Amingruppen des Kollagens reagieren. Hierfür wurden zwei Konzentrationen an PEG-SG anhand des molaren Verhältnisses der primären Amine im Kollagen und des N-hydroxysuccinimid-Esters des PEG-SG ausgesucht, um eine theoretische maximale Quervernetzung von 50 % (PEG-SG₅₀) oder 100 % (PEG-SG₁₀₀) aller freien Amine zu erreichen. Durch die kovalente Verbindung von PEG-SG und den Kollagenfibrillen sollte

die Struktur stabilisiert werden. Diese Hypothese konnte im Verlauf des Forschungsprozesses als wissenschaftliche These verifiziert werden, da die Kollagenhydrogele eine steigende mechanische Stabilität mit höheren Konzentrationen an PEG-SG zeigten. Das Widerstehen der Kollagenhydrogele gegenüber der Degradation durch Kollagenase war ein weiterer Effekt der Quervernetzung^{26, 28, 33}. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die enzymatische Schnittstelle der Kollagenase durch die Quervernetzung maskiert wurde³³. Das würde bedeuten, dass die cornealen Modelle länger formstabil bleiben und somit reproduzierbarere Ergebnisse liefern können. Zusätzlich könnte diese Erkenntnis für die Herstellung von Implantaten nützlich sein, da die mechanischen Eigenschaften der vernetzten Kollagenhydrogele eine bessere Einarbeitung in die native Cornea ermöglichen und langsamer abgebaut werden, was die Chance einer erfolgreichen Implantation erhöht.

Zusätzlich war die Transparenz der quervernetzten Kollagenhydrogele deutlich erhöht - im Gegensatz zu den nicht quervernetzten. Das könnte zum einen das Live-Imaging der Zellen in in vitro-Modellen ermöglichen und zum anderen eine weitere Analysemethode für die Evaluation des Augenreizungspotentials darstellen. Für den Augenreizungstest könnte man die Transparenz vergleichbar zum Draize-Augenreizungstest, bei dem die Klarheit der Cornea ein zentrales Bewertungskriterium war, in den in vitro-Test aufnehmen¹⁸. Darüber hinaus könnte das quervernetzte Kollagen interessant als Implantat sein, da es transparent sein muss.

Zur weiteren Aufschlüsselung der Ursache für die Transparenz der quervernetzten Hydrogele, wurde die Kollagenanordnung genauer durch Transmissions- und Rasterelektromikroskopie untersucht. Die REM- und TEM-Aufnahmen wiesen weniger Kollagenfibrillen in Abhängigkeit von der PEG-SG-Konzentration nach. Es wurde bereits berichtet, dass die Trübung proportional zur Menge der fibrillären Strukturen ist und Veränderungen in der Transparenz mit einer Störung der Fibrillenformation zusammenhängen könnten³⁴⁻³⁵. Dagegen zeigte das nicht quervernetzte Kollagenhydrogel ein homogenes Netzwerk von Fibrillen mit 70 nm Dicke und dem typischen Bänderungsmuster der D-Periode³⁴. Das unterstützt die Hypothese, dass PEG-SG die Fibrillenformation von Kollagen während der pH-induzierten Gelierung des gelösten Peptids inhibiert. Das Phänomen wurde bereits von Yunoki und Matsuda beschrieben, die von einer intrafibrillären Quervernetzung während der Fibrillenformation ausgehen³⁶. In diesem Fall war sowohl nicht-fibrilläres Kollagen durch eine frühzeitige Quervernetzung der Kollagenfibrillen und zugleich waren auch Kollagenfibrillen in einer Doppelstruktur zu finden (Abbildung 13).

Nach der chemischen und mechanischen Evaluation des quervernetzten Kollagenhydrogels wurde die zelluläre Reaktion auf die Quervernetzung untersucht. Da die Quervernetzung während der Anwesenheit der Zellen stattfindet, wurde als erstes eine ausführliche Analyse mit dermalen Fibroblasten durchgeführt, um einen zytotoxischen Effekt auszuschließen. Die Viabilität der Fibroblasten im Kollagen, das mit PEG-SG₅₀ quervernetzt

wurde, ähnelte dem nicht quervernetzten. Allerdings erwies sich die Viabilität der Kollagenhydrogele, die mit PEG-SG₁₀₀ quervernetzt wurden, signifikant geringer. Um herauszufinden, ob die geringere Viabilität durch Zelltod oder eine geringere Proliferation zustande kam, wurde ein LDH-Test zur Prüfung der Zellintegrität angeschlossen³⁷. Da die LDH-Konzentration nicht signifikant im quervernetzten Kollagenhydrogel anstieg und somit ein Zellsterben ausgeschlossen werden kann, scheint PEG-SG₁₀₀ eher eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation zu haben als einen akuten toxischen Effekt. Dies könnte auf eine physische Inhibition der Zellen hinweisen. Die Zellen sterben zwar nicht können, aber aufgrund der Starrheit beziehungsweise des hohen E-Modulus des PEG-SG₁₀₀ Hydrogels auch nicht ausbreiten. Des Weiteren könnte das Fehlen der Kollagenfibrillen im PEG-SG₁₀₀ mit dem Verlust von Zell-Matrix Verbindungen einhergehen, die wiederum wichtige Signale für die Proliferation der Zellen liefern.

Zur Klärung, ob ein langzeit-stabiles, nicht kontrahierendes Kollagenhydrogel durch die chemische Quervernetzung mit PEG-SG hergestellt werden kann, wurde eine Kontraktionsstudie mit dermalen Fibroblasten besiedelten Kollagenhydrogelen durchgeführt. Dermale Fibroblasten wurden eingesetzt, da sie Kollagenhydrogele schneller und stärker kontrahieren als die stromalen Zellen (Abbildung 12). Im Gegensatz zum nicht quervernetzten Kollagenhydrogel waren beide PEG-SG Konzentrationen ausreichend, um nahezu die gesamte Kontraktion zu verhindern. Die Quervernetzung mit PEG-SG erhöhte zudem den E-Modulus. Vorangehende Studien haben Zugkräfte von Fibroblasten auf Kollagenfibrillen als Mechanismus für die Kontraktion *in vitro* beschrieben^{73,124-128}. Diese Einsichten zusammengenommen, könnten als ein Hinweis auf ein starrerere molekulares Netzwerk verstanden werden, dass die Zellen daran hindert, das Kollagenhydrogel zu kontrahieren. Berücksichtigt man zusätzlich den aus den REM- und TEM-Aufnahmen gewonnenen Eindruck, dass weniger Kollagenfibrillen in den quervernetzten Kollagenhydrogelen gefunden wurden, könnten die Zellen auch weniger Ansatzpunkte gehabt haben, ihre Kontraktionskraft auf das Hydrogel auszuüben. Im Anschluss an die Analyse der PEG-SG-Quervernetzung mit dermalen Fibroblasten, wurden quervernetzte Kollagenhydrogele eingesetzt, um stromale Äquivalente zu generieren. In diesen Experimenten wurde mit PEG-SG₅₀, das theoretisch 50 % der freien Amine quervernetzt, weitergearbeitet, da PEG-SG₅₀ die vorteilhafte Stabilität des Hydrogels mit einer vergleichbaren Proliferation der Zellen wie im nicht quervernetzten Kollagenhydrogel verband. Hierbei zeigten die mit PEG-SG₅₀ quervernetzten Rattenschwanz- und Rinderhautkollagenhydrogele eine ähnliche Verteilung der stromalen Zellen wie in der nativen Cornea und wiesen keine Kontraktion auf (Abbildung 14).

Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass PEG-SG₅₀ eingesetzt werden kann, um kollagenbasierte Stroma-Äquivalente herzustellen, die während der Gewebereifung nicht kontrahieren und transparent sind. Das könnte zur reproduzierbaren Generation von

Stroma-Äquivalenten für in vitro-Testungen und klinische Applikationen führen. Gleichwohl, existieren eine Vielzahl an Methoden Stroma-Äquivalente zu generieren für Applikation in vitro- und in vivo. So wurden schon Äquivalente aus rekombinantem humanen Kollagen, aus Fibrin und aus Seide, aber auch aus synthetischen Materialien entwickelt¹²⁹⁻¹³¹. Trotz der Vielfalt der getesteten Ansätze und Materialien ist in diesem Kontext noch nicht ein Durchbruch gelungen. Oft erzielen die Äquivalente in einem Teilaspekt hervorragende Ergebnisse wie Transparenz, Stabilität, Brechkraft, Biokompatibilität, Integration oder Operierbarkeit, aber sie verfehlen regelmäßig, das ganze Spektrum dieser Eigenschaften abzudecken. Deswegen wird die Hauptaufgabe darin bestehen, diese Eigenschaften in dem erwünschten Äquivalent zu vereinen. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde hier durch Kombination eines biokompatiblen, stabilen und transparenten, auf Kollagenbasis entwickelten stromalen Äquivalents erreicht.

Schließlich sollte eine Hemi-Cornea aus dem quervernetzten Stroma-Äquivalent und den epidermalen Zellen generiert werden. Dazu wurden stromalen Zellen im PEG-SG₅₀ quervernetztes Hydrogel generiert und im Anschluss mit primären humanen cornealen Epithelzellen besiedelt. Die stromalen Zellen wiesen eine normale Verteilung im quervernetzten Kollagenhydrogel auf. Das Epithel formte 2-3 Zellschichten. Jedoch war das Epithel im Vergleich zu den Epithelmodellen ohne Stroma stark verhornt. Dies legt den Schluss nahe, dass die stromalen Zellen oder die Trägerstruktur Einfluss auf den Differenzierungsprozess der primären cornealen Epithelzellen hatten (Abbildung 15). Um auszuschließen, dass der Effekt durch die Quervernetzung auftritt, wurde ein Cornea-Äquivalent mit nicht quervernetztem Rattenschwanzkollagen und RPE-Zellen als Endothelersatz aufgebaut. Auch hier waren die stromalen Zellen gleichmäßig verteilt und das Epithel formte nur zwei Schichten. Die RPE-Zellen wurden als Ersatz für das Cornea-Endothel eingesetzt, das post-mitotisch ist. Die RPE-Zellen formten eine einzelne Zellschicht unterhalb des Stroma-Äquivalents vergleichbar zum Cornea-Endothelium (Abbildung 16).

Das Ergebnis dieser Studie legt nahe, dass Kollagenhydrogele und quervernetzte Kollagenhydrogele eingesetzt werden können, um Cornea-Äquivalente zu generieren, die während der Gewebereifung nicht kontrahieren. Trotzdem zeigte sich die Formation des Epithels beeinflusst. Das könnte zum einen an den xenogenen Kollagenen aus Ratte oder Rind liegen, die die Differenzierung der Epithelzellen angetrieben haben. Als weiterer Parameter könnten zum anderen die stromalen Zellen gelten, die Einfluss auf die Entwicklung des Epithels nehmen¹³². Der Einsatz von Retinsäure könnte hier der Verhornung entgegenwirken. So senkt Retinsäure die Transglutaminaseaktivität, verhindert die Bildung von Proteinen des „cornified envelopes“ und hat in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, dass die Verhornung in Hautzellen unterdrückt wurde^{133,134}.

Im Vergleich zu dem in dieser Dissertation generierten Hemi-Cornea-Modell sind bereits zwei Hemi-Cornea-Modelle aus Zelllinien und Kollagenhydrogel als Stroma-Äquivalent von Bartok und Zorn-Kruppa beschrieben worden. In ihren Studien konnten sie zeigen,

das Hemi-Cornea-Modelle dazu geeignet sind, das Augenreizungspotential durch die Tiefe der Verletzung vorherzusagen^{78,135,136}. Ein weiterer Ansatz, der publiziert wurde, nutzt Vitrigel als Ausgangspunkt, also ein Kollagengel das geliert, dehydriert und wieder rehydriert wird als Stroma-Äquivalent und immortalisierte Zellen, um einen MTT-basierten Augenreizungstest durchzuführen¹³⁷. Die dargestellten Modelle basierten jedoch ausnahmslos auf immortalisierten Zelllinien. Der hier durchgeführte Ansatz förderte die Entwicklung eines Cornea-Äquivalents auf der Basis von primären Zellen. Obwohl die Ergebnisse eine Grundlage für kommende pharmakologische Testungen und die Entwicklung zellbasierter Implantate bieten, sind noch weitere Forschungsbemühungen wünschenswert und lohnend, bevor das Voll-Cornea-Äquivalent zum Einsatz kommen kann.

5.3 Ein neuer Messparameter: Der TEER-Wert bei 1000 Hz

Parallel zur Fabrikation der Cornea-Modelle wurde die Impedanzspektroskopie eingesetzt, um die Analysemethode für in vitro-Augenirritationstests zu verbessern.

Ein integraler Bestandteil der in dieser Arbeit publizierten Methode ist ein mathematisches Modell, um quantitative Daten aus den Impedanzspektren zu gewinnen⁹⁰. Obwohl das Modell eine genaue Bestimmung der elektrischen Parameter wie Kapazität und Ohmscher Widerstand erlaubt, benötigt die Methode trainiertes Personal und ein spezielles Programm, um die Simulation durchzuführen. Da die toxikologischen Tests auf einfachen und schon verfügbaren Technologien basieren sollten, die eine leichte Weiterverbreitung ermöglichen, wurde ein neuer Parameter auf der Basis der Impedanz bei einer spezifischen Frequenz definiert. Die beste Vorhersagekraft und Robustheit wurde bei 1000 Hz erreicht. Deswegen wurde ein TEER-Wert bei dieser Frequenz als Analyseparameter gewählt. Herkömmliche Messsysteme wie das EVOM-System, die mit einer Frequenz von 12,5 Hz arbeiten, wurden entwickelt, um einschichtige Epithelien und Endothelien zu evaluieren. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass die Vorhersagekraft eines TEER-Wertes gemessen bei 12,5 Hz für dreidimensionale Gewebe limitiert war, da die Differenz bei dieser Frequenz zwischen der unbesiedelten Membran und dem maturierten Modell nur 19,9 dB (9,9 Ω) betrug, wohingegen bei einem TEER-Wert gemessen bei 1000 Hz eine Differenz von 36,6 dB (67,7 Ω) erreicht werden konnten. Dies lässt sich einmal auf die Überlagerung der Modellbarriere von dem Eigenwiderstand der Elektroden im niedrigen Frequenzbereich zurückführen und darauf dass im höheren Frequenzbereich die Zelllagen mehr Einfluss auf die Messung haben als die Tight Junctions⁹⁰. Die Anpassung der Analyse der TEER-Messung und ihre Kombination mit dem Epithelmodell sollte in erster Linie dazu dienen, den in vitro-Augenirritationstest zu verfeinern (Abbildung 17).

Zusammen mit der Analyse der TEER-Messung wurde eine Messapparatur für die Impedanzspektroskopie entwickelt. Die Messkammer wurde speziell dafür designt und gebaut,

schnelle Impedanzmessungen von in vitro-3D-Modellen in 24-Well-Multititerplatten-Inserts zur Augenreizungstestung durchzuführen. Die Kammer liefert sterile Konditionen während der Datenerhebung und erlaubt somit wiederholte zerstörungsfreie Messungen auch über eine längere Kulturzeit. Alle 24 Messplätze lieferten präzise Messungen und wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen 1 Hz-100 kHz zueinander auf (Abbildung 19). Zusätzlich konnte mithilfe eines mechanischen Relais, das an den Sub-D-Stecker angeschlossen wird, die automatische Messung der einzelnen Messplätze realisiert werden. In der Zukunft kann die Sensitivität der Stahlelektroden noch weiter durch eine TiN-Beschichtung verbessert werden, die den Eigenwiderstand der Elektroden reduziert. So konnte in einem Kooperationsprojekt gezeigt werden, dass das Hintergrundrauschen von 75 % auf 5 % mit TiN-beschichteten Elektroden reduziert werden konnte. Des Weiteren erlaubt die niedrige Prozesstemperatur zur Herstellung der TiN-Beschichtung die Applikation auf eine Vielzahl weiterer Materialien, wie zum Beispiel kommerziell erhältlichen Zellkulturwaren. Eine solche Beschichtung würde eine noch präzisere Messung in den niedrigeren Frequenzbereichen erlauben¹³⁸. Eine Vergrößerung der Elektroden an sich könnte darüber hinaus zu einer robusteren Analyse führen, da Nebeneffekte durch die Positionierung der Stäbchenelektroden umgangen werden könnten. Diese Verbesserungen der Messkammer wären insbesondere für einschichtige Epithelien und Endothelien interessant.

Es existieren schon kommerziell erhältliche Messkammern wie das EVOM. Die für diese Forschungsarbeit extra gebaute Messkammer hat jedoch zwei Vorteile: sie erlaubt einerseits eine schnellere Impedanzmessung und ermöglicht andererseits die flexible Anpassung der jeweiligen TEER-Messung an das entsprechende Modell. Die Messapparatur ist autoklavierbar und kann auch mit herkömmlichen Zellkulturplatten genutzt werden (Abbildung 18).

Hiermit war die parallele Entwicklung des Modells und der Analysemethode soweit gediehen, diese in das bestehende Augenirritationsprotokoll der OECD TG 492 schrittweise zu integrieren und deren Mehrwert zu evaluieren.

5.4 Der in vitro-Augenreizungstest für alle GHS-Kategorien

Trotz der jahrzehntelangen Forschung über die Augenirritationstestung scheint es einen Mangel an Daten in Bezug auf die Frage zu geben, ob die verschiedenen Modelle nicht in der Prognosefähigkeit der Augenreizungstests differieren. Deshalb wurde ein Augenreizungstest nach dem Protokoll der OECD TG 492 mit den entwickelten Modellen durchgeführt und deren Vorhersagekraft evaluiert. Die Testsubstanzen wurden aus allen GHS-Kategorien ausgewählt, um die Prädiktion der Modelle zu untersuchen. Toluol und Citrat wurden als unharmonisierte Testsubstanzen ausgewählt, um weitere Einblicke in deren Klassifikation zu erhalten.

Im MTT-basierten Augenreizungstest schnitt das RCE-Modell am besten ab und konnte am ehesten zwischen irritativen und nicht-irritativen Substanzen unterscheiden. Signifikante Unterschiede konnten zwischen nicht kennzeichnungspflichtigen und Kategorie 1-Substanzen sowie eine Tendenz zwischen nicht kennzeichnungspflichtigen und Kategorie 2-Substanzen gefunden werden. Das deutet darauf hin, dass das RCE-Modell für einen MTT-basierten Test geeignet ist, vergleichbar mit der OECD TG 492⁸². Doch aufgrund von Spendervarianzen ist noch Raum für Verbesserung bei der Selektion der Spender. Hier könnte durch erhöhte Qualitätskontrollen der Zellen und deren Modellen mithilfe von Proliferationsmessungen, MTT-Tests und Histologie eine Biobank geeigneter Spender etabliert werden, die Abweichungen in den Tests aufgrund der Spenderherkunft verhindert. Das mRHE konnte zwischen nicht kennzeichnungspflichtigen und Kategorie 1-Substanzen differenzieren, was zunächst unzureichend für eine Risikobewertung erscheint, da reizende Kategorie 2-Substanzen und nicht-reizende Substanzen nicht unterschieden werden können. Nichtsdestotrotz beweist die OECD TG 492 das epidermale Epithelzellen als Modellgrundlage geeignet sind⁸². Die Unterschiede zwischen den Modellen und der publizierten Methode könnten mit der kleineren Auswahl an Testsubstanzen zusammenhängen. Vor allem aber auch darin begründet liegen, dass ein weiterer Fokus dieser Studie darauf gerichtet ist, nicht-harmonisierte Substanzen wie Citrat und Toluol zu untersuchen, um neue Einsichten in deren Kategorisierung zu gewinnen, was die Interpretation der Daten verkompliziert^{135,136}. Das RHE war in der MTT-Analyse nicht in der Lage, zwischen den Kategorien zu unterscheiden. Dies hat Sinn, da das RHE eine Hornschicht mit deutlich höhere Barriere besitzt als die Cornea. Die verkürzte Kulturdauer im mRHE führte hingegen zum Einsatz des Modells, bevor sich eine Hornschicht bilden kann. Die Zellen, die nun nicht geschützt durch ein stratum corneum sind wie auch in der Cornea und dem RCE, waren den Testsubstanzen direkt ausgesetzt (Abbildung 9). Dies führte zu weniger viablen Zellen und damit einer besseren Unterscheidung der Kategorien. Die unterschiedlichen Proteinnetze, die im RCE und mRHE zu finden waren, schienen hingegen nur einen untergeordneten Einfluss auf die toxikologische Bewertung im MTT-Test zu haben. Das unterstützt die Hypothese, dass die Zellherkunft, auch wenn sie zu unterschiedlicher Markerexpression in den Modellen führt, keine entscheidende Rolle in der Kategorisierung von Substanzen für die Augenreizung spielt (Abbildung 20). Die Zellherkunft könnte jedoch in Bezug auf die Aufnahme und den Metabolismus für Medikamente eine wichtigere Rolle spielen.

Der derzeitige in vitro-Augenreizungstest folgt dem experimentalen Ansatz, der für die Identifikation von hautreizenden und -korrodierenden Substanzen entwickelt wurde. Nach der Applikation der Testsubstanzen wird das Modell mittels MTT-Test gemessen und kategorisiert nach der verbleibenden Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle. Dagegen muss bei der Klassifikation der Augenreizung auch die Persistenz der Reaktion Beachtung finden oder anders formuliert: Ist der Effekt reversibel oder nicht? Im Draize-

Augenreizungstest wird die Unterscheidung der Kategorie 2, reversible Effekte, von Kategorie 1, irreversible Effekte, durch die Beobachtung des Kaninchenauges über 21 Tage vorgenommen. Ist der Schaden innerhalb von 7 Tagen beziehungsweise 21 Tagen reversibel, werden die Testsubstanzen als Kategorie 2B oder 2A von den Vereinten Nationen kategorisiert. Um reversible Effekte zu evaluieren, kommen die gebräuchlichen kolorimetrischen Tests an ihre Grenzen, da ihnen die Fähigkeit fehlt, dasselbe Gewebe wiederholt über die Zeit zu messen und deshalb hauptsächlich nur die metabolisch hochaktiven Basalzellen gemessen werden. Als komplementäre Methode sollte die Impedanzspektroskopie den Test verfeinern, da sie zerstörungsfrei Effekte auch in den oberen Zell-Lagen messen kann⁹⁰. Zur Überprüfung der Hypothese, ob die neue TEER-Messung eine Verbesserung der Vorhersagekraft erlaubt, wurde der TEER_{1000 Hz} vor der Substanzapplikation und kurz danach vor der MTT-Messung aufgenommen und auf die negative Kontrolle hin normalisiert.

Die TEER_{1000 Hz}-Messung demonstrierte, dass die elektrische Analyse kleine Unterschiede in der Barriere zwischen den Modellen erkannte im Vergleich zum MTT-basierten ET₅₀-Test (Abbildung 9). Im Augenirritationstest bestätigte sich diese Observation. Zum einen konnte mit der TEER_{1000 Hz}-Messung ein Abfall der Barriere nach Applikation der Kategorie 2-Substanzen Ethanol und Aceton unter 45 % und damit ein irritativer Effekt im Gegensatz zum MTT-Test im mRHE und RHE nachgewiesen werden. Zum anderen fielen die TEER-Werte der Kategorie 1-Substanzen mit Werten unter 5 % weiter ab als die der Kategorie 2. Somit konnte die Fähigkeit von mRHE und RHE, zwischen irritativen und nicht irritativen Kategorien zu unterscheiden, verbessert werden. Die Differenzen im RCE waren jedoch kleiner und heterogener zwischen den Kategorien, was zu keiner Verbesserung der Kategorisierung geführt hat. Das könnte daran liegen, dass die Barriereigenschaften des Modells von Natur aus noch niedriger sind und dadurch leichter von Spendervarianzen überschattet wurden. Zusammenfassend demonstriert der Einsatz eines neuen Messwerts neben dem MTT-Test eine signifikante Verbesserung der Testmethode (Abbildung 21).

Zur Evaluierung aller GHS-Kategorien im Zusammenhang mit der Augenirritation ist es wichtig, die Treiber der Augenirritation zu verstehen. Für Kategorie 2-Substanzen wird durch die Beobachtung des Kaninchenauges über 21 Tage die Reversibilität des Effekts festgestellt. Dies ist besonders bedeutend, da die Mehrheit der Kategorie 1-Chemikalien (65 %) nur auf der Grundlage der Persistenz des Effekts klassifiziert wurden. Sprich: Die Qualität der Verletzung ist zweitrangig im Vergleich zur Persistenz¹⁸. Diese Beobachtung hebt die Bedeutung einer zerstörungsfreien Messmethode hervor, die die Durchführung wiederholter Messungen erlaubt. Die TEER-Messung ist durch wiederholte zerstörungsfreie Messungen am selben Modell wie im Draize-Augenreizungstest in der Lage, reversible Effekte über die Zeit zu untersuchen (Abbildung 22). Deshalb wurde die Testme-

thode weiterentwickelt, in der der $TEER_{1000\text{ Hz}}$ nicht nur vor und direkt nach der Testsubstanzapplikation durchgeführt wird, sondern auch mehrfach über die anschließende Postinkubation von 11 Tagen.

Da das mRHE vielversprechende Ergebnisse in den vorangegangenen Versuchen lieferte, wurde nur dieses Modell für den impedanzbasierten Reversibilitätstest eingesetzt. Für jede Kategorie kann ein klares Muster der Reversibilität oder Irreversibilität des Effekts durch die $TEER_{1000\text{ Hz}}$ Messungen identifiziert werden. Nicht kennzeichnungspflichtige Chemikalien, die keine Kategorie haben, verbleiben bei 100 % der Kontrolle über die 11 Tage und zeigen abgesehen von Toluol keinen Effekt. Es konnte zwar ein Abfall des $TEER_{1000\text{ Hz}}$ -Wertes direkt nach der Applikation beobachtet werden, der aber im Mittel über 60 % blieb. Da das Testprocedere mehrere Waschungen beinhaltet, die die Barriere beeinflussen, könnte dies den Effekt wahrscheinlich erklären. Die Barriere von Toluol hingegen fiel über die 11 Tage kontinuierlich ab. Der $TEER_{1000\text{ Hz}}$ der Kategorie 1-Substanzen sank unter 6 % nach der Substanzapplikation. Anschließend wies das behandelte Gewebe keine Zeichen der Erholung auf. Die Barriere blieb unter 6 % und stieg auch nicht mehr in den 11 Tagen der Beobachtung an. Kategorie 2-Substanzen zeigten auch eine ausgeprägte Senkung des $TEER_{1000\text{ Hz}}$ -Werts nach Applikation unter 60 %, was einen irritativen Effekt verrät. Aber im Gegensatz zu Kategorie 1-Substanzen stieg der Wert mit der Zeit wieder über 50 % an und demonstriert damit eine Regeneration der Barriere und die Reversibilität des Effekts.

Anhand dieser Daten konnte ein Prädiktionsmodell, das zwei Zeitpunkte für die Kategorisierung aller GHS-Kategorien zulässt, erarbeitet werden (Abbildung 23). Direkt nach der Applikation dient der Schwellenwert bei 60 % dazu, nicht irritative von irritativen Substanzen zu unterscheiden, das heißt, um zwischen „keiner Kategorie“ sowie Kategorie 1 und Kategorie 2 zu unterscheiden. Die Messung an Tag 7 mit einem Impedanz-Schwellenwert von 50 % wird genutzt, um Kategorie 2- und Kategorie 1-Substanzen voneinander zu trennen. Substanzen, die eine Erholung von über 50 % nach 7 Tagen erzielen, werden als Kategorie 2 klassifiziert. Effekte, die länger als 7 Tage persistieren, sind indikativ für eine schwere Augenschädigung und werden somit der Kategorie 1 zugeordnet. Im dem Fall, dass eine Substanz zunächst zu einem Impedanzwert über 60 % nach der Applikation führt, dann jedoch an Tag 7 unter 50 % fällt, wird ein sich langsam entwickelnder persistenter Effekt angenommen und somit auch als der Kategorie 1 zugehörig klassifiziert.

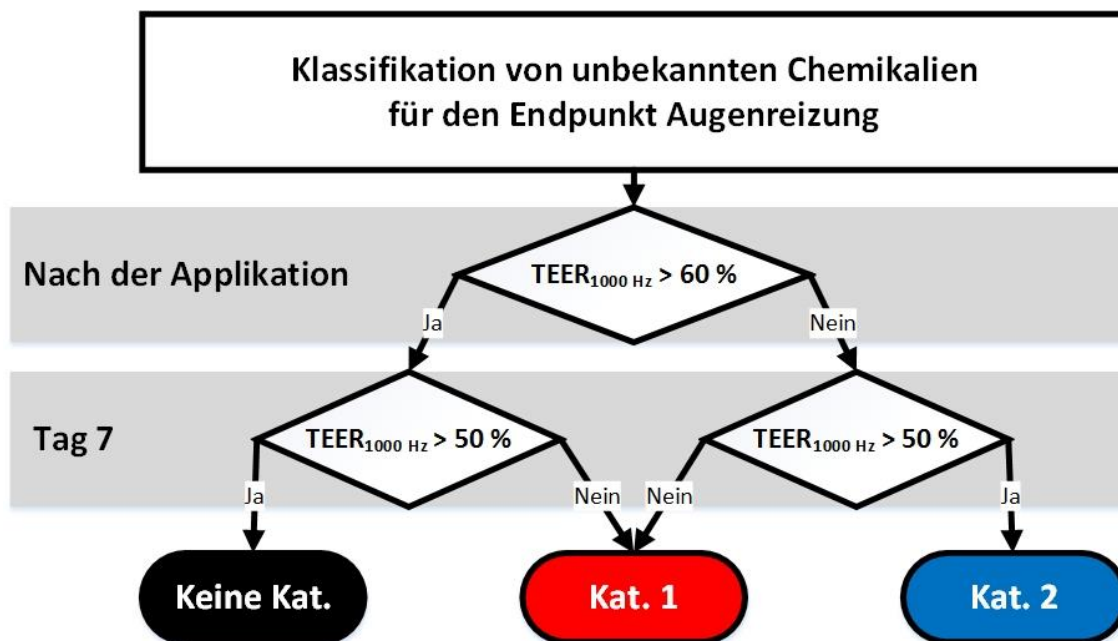


Abbildung 23: TEER_{1000 Hz}-Prädiktionsmodell zur Klassifizierung der GHS-Kategorien für die Augenirritation.

Durch dieses Prädiktionsmodell entsteht der erste in vitro-Test, der zwischen allen GHS-Kategorien für Augenirritation in einem Test mit einer Genauigkeit von 78 % unterscheiden kann. Darüber hinaus konnte eine Reproduzierbarkeit zwischen den Testläufen von 88,9 % erzielt werden mit der einzigen Ausnahme, dass Glycerol in einem der drei Testläufe einmal als Kategorie 2 eingestuft wurde und in den anderen beiden als „keine Kategorie“. Obwohl Toluol und Citrat teilweise als nicht kennzeichnungspflichtige Chemikalien „keiner Kategorie“ nach GHS zugeordnet wurden, deutet dieser Test auf eine stärkere irritative Kapazität der beiden Substanzen hin. Dieser Verdacht wurde auch schon von mehreren anderen Studien unter anderem von der Multilaborstudie zur Validierung des EpiOcularsTM beschrieben, die zu demselben starken irritativen Effekt für Toluol und Citrat kommen^{62,137,139,140}. Hinzu kommt, dass Toluol als von der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA, englisch European Chemicals Agency) als Hautirritant eingestuft wurde. Berücksichtigt man diese nachprüfbareren Fakten, hat der Test eine Genauigkeit von 100 % erzielt.

Tabelle 17: Kategorisierung der getesteten Substanzen mit dem TEER_{1000 Hz}-Prädiktionsmodell.

Testsubstanz	Nach d. App.	Tag 7	Prognose	GHS
Glycerol	> 60 %	> 50 %	„Keine Kat.“	„Keine Kat.“
Kaliumtetrafluorobat	> 60 %	> 50 %	„Keine Kat.“	„Keine Kat.“
Toluol	> 60 %	< 50 %	Kategorie 1	„Keine Kat.“
Aceton	< 60 %	> 50 %	Kategorie 2	Kategorie 2
Ethanol	< 60 %	> 50 %	Kategorie 2	Kategorie 2
Citrat	< 60 %	< 50 %	Kategorie 1	Kategorie 2
Imidazol	< 60 %	< 50 %	Kategorie 1	Kategorie 1
Benzalkoniumchlorid	< 60 %	< 50 %	Kategorie 1	Kategorie 1
Natriumlaurylsulfat	< 60 %	< 50 %	Kategorie 1	Kategorie 1

Schließlich verfügt diese Methode über das Potential, die Subkategorien 2A und 2B anhand der Regenerationsdauer der Barriere den Kategorien zuzuordnen. Die Bedeutung Unterscheidung der Subkategorien für Augenirritation variiert jedoch auch zwischen den Regulatoren, sodass beispielsweise die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 zur Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung (Regulation on classification, labelling and packaging, CLP) von Stoffen und Gemischen bei der Annäherung an die UN-GHS-Richtlinien von der Europäischen Union nicht mit einbezogen worden ist. Das heißt, dass für die europäische Union die Klassifizierung in die Subkategorien 2A und 2B nicht nötig ist. Des Weiteren haben TEER-Messungen bei einer Frequenz von 12,5 Hz bewiesen, dass die Impedanzmessung eine vielversprechende Methode ist, 118 Chemikalien für das Augenreizungspotential zu untersuchen¹³⁷. In dieser Studie wurde allerdings nur 3 Minuten nach der Applikation gemessen, was folglich keine Evaluation der Reversibilität des Effekts erlaubte. Darüber hinaus konnte hier gezeigt werden, dass die TEER-Messung bei 1000 Hz sensitiver als bei 12,5 Hz ist, um corneale Modelle zu evaluieren. Nach allem, was die Forschung in diesem Zusammenhang bisher beschrieben hat, ist der porcine corneale Reversibilitätstest (Porcine Corneal Ocular Reversibility Assay, PorCORA) der einzige ex vivo-Test, der für eine ausgewählte Kohorte von Substanzen zwischen den GHS-Kategorien für Augenirritation in einem einzigen Test unterscheiden kann³¹. Anzumerken bleibt, dass dieser Test auf procinen Augen aufbaut, was wiederum zu Speziesunterschieden führen kann und noch auf tierisches Material angewiesen ist. Darüber hinaus fehlen größere Studien die die Robustheit des Tests beweisen. Somit gibt es keine Validierung des PorCORA durch die Behörden.

Die systematische Analyse der in vitro-Modelle aus cornealen und epidermalen Epithelzellen identifizierte anatomische und molekulare Unterschiede. Nichtsdestotrotz konnten

das RCE und mRHE als angemessene Modelle für Identifikation von gefährlichen Chemikalien für das Auge eingesetzt werden. Des Weiteren führte die Implementation der Impedanzspektroskopie zu einer präziseren Analysemethode im Vergleich zum MTT-Test. Schlussendlich, erlaubte der Einsatz einer nicht destruktiven Messmethode wiederholte Datenerhebungen zur Evaluation der Reversibilität oder Persistenz von Effekten. Diese Forschungsfortschritte ermöglichten es zum ersten Mal, dass alle GHS-Kategorien im Zusammenhang mit der Augenirritation in einem einzigen in vitro-Test klassifiziert werden konnten.

Der nächste Schritt würde eine größere Auswahl an Testsubstanzen vorsehen, um mögliche Limitationen der TEER-Messungen zu identifizieren, und mit einer Validationsstudie abschließen, um die OECD TG 492 zu verbessern sowie den Draize-Augenreizungstest obsolet zu machen.

6 Ausblick

Die hier durchgeführte Studie bewies, dass alle GHS-Kategorien mit dem mRHE-Modell und der TEER_{1000 Hz}-Messung in einem alleinstehenden in vitro-Test identifiziert werden können. Als nächster Schritt steht die Validierung der neuen Testmethode durch die EURL ECVAM an. Dafür sollten mehr Testsubstanzen untersucht werden, um die Limitationen des Systems zu definieren. Ausgangspunkt könnte die Auswahl an 80 Referenzchemikalien für die Augenirritation sein, die vom Konsortiums für in vitro-Augenirritationstestung publiziert wurden¹⁴¹.

Des Weiteren könnte das RCE-Modell - basierend auf primären humanen Epithelzellen – zugleich als Modell für die präklinische Testung von Pharmaka eingesetzt werden. Die solide fundierte Methode zur Herstellung eines Stromäquivalents mithilfe von PEG-SG birgt Entwicklungsmöglichkeiten, die unter anderem für weitere Anwendungen wie Implantaten für die Cornea und die Haut genutzt könnten⁸⁸. Das Cornea-Äquivalent kann durch Anpassung des Mediums weiterentwickelt werden, sodass es zur Evaluation von pharmakologischen Testungen beiträgt. Vor diesem Hintergrund wurde bereits ein neues Modell in Kooperation mit der Augenklinik Würzburg vorangetrieben, welches mittels plastischer Kompression von Kollagen und immortalisierten Zellen für corneale Wundheilung sorgt. Das Modell konnte mithilfe eines chirurgischen Lasers verwundet werden und bei unterschiedlichen Behandlungen gezeigt werden, dass es Potential für ein Cornea-Äquivalent enthält⁴⁴.

Darüber hinaus ermöglicht der Fortschritt mit induzierten pluripotenten Stammzellen (IPS) neue Entwicklungen im Tissue Engineering des Auges. Ein Protokoll, publiziert von Hayashi et al., belegt methodisch nachvollziehbar die Gewinnung cornealen Epithelzellen aus IPS¹⁴². Diese Methode könnte adaptiert werden, um die Spendervarianzen der primären cornealen Zellen zu umgehen. Aber nicht nur im vorderen Augenteil der Cornea, sondern auch im hinteren Teil des Auges konnte die Retina aus IPS gewonnen werden¹⁴³. Ein so komplexes Gewebe wie die Retina, die aus selbst-organisierten Zellorganoiden besteht, könnte als in vitro-Testsystem oder Implantat große Neuerungen bringen. Weitere Entwicklungen eröffnen sich an den Schnittstellen der Wissenschaften durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Medizinern, Ingenieuren und Biomedizinern. So konnte für Hornhautbanken, die die Lagerung von Transplanten organisieren, ein Bioreaktor in Kooperation entworfen und gebaut werden, der die Lagerungsqualität unter in vivo-Bedingungen von Spender-Corneas verbessert⁴⁴.

Die wissenschaftliche Quintessenz dieser Dissertation lautet kurz zusammengefasst: Das Tissue Engineering des Auges bedeutet – auch wegen neuerer Entwicklungen in der IPS-Forschung für pharmakologische Testungen und Augenrekonstruktion - einen biomedizinischen Neubeginn, der tierbasierte toxikologische Tests wie den Draize-Augenreizungstest als Relikte einer weitgehend überholten Methodik der Wissenschaftsgeschichte erscheinen lässt.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Lotz, C. *et al.* Alternative methods for the replacement of eye irritation testing. *ALTEX Alternatives to animal experimentation* **33**, 55-67, (2016).
- 2 Drenckhahn, D. *Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem.* (Elsevier, Urban & Fischer, 2008).
- 3 Daniels, J. T., Dart, J. K., Tuft, S. J. & Khaw, P. T. Corneal stem cells in review. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **9**, 483-494, (2001).
- 4 Meek, K. M. & Boote, C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental eye research* **78**, 503-512, (2004).
- 5 Johnson, D. H., Bourne, W. M. & Campbell, R. J. The ultrastructure of Descemet's membrane. II. Aphakic bullous keratopathy. *Archives of ophthalmology* **100**, 1948-1951, (1982).
- 6 Wilhelmus, K. R. The Draize eye test. *Survey of ophthalmology* **45**, 493-515, (2001).
- 7 Casarett, L. J., Doull, J. & Klaassen, C. D. *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons.* 7th edn, (McGraw-Hill, 2008).
- 8 Maurer, J. K., Parker, R. D. & Jester, J. V. Extent of initial corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **36**, 106-117, (2002).
- 9 Jester, J. V. Extent of corneal injury as a biomarker for hazard assessment and the development of alternative models to the Draize rabbit eye test. *Cutaneous and ocular toxicology* **25**, 41-54, (2006).
- 10 Scott, L. *et al.* A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **24**, 1-9, (2010).
- 11 Draize, J. H., Woodard, G. & Calvery, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **8**, 377-390, (1944).
- 12 OECD. *Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion.* (OECD Publishing, 2012).
- 13 United Nations. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, Rev.4)*, 2011).
- 14 Griffith, J. F., Nixon, G. A., Bruce, R. D., Reer, P. J. & Bannan, E. A. Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. *Toxicology and applied pharmacology* **55**, 501-513, (1980).
- 15 Doucet, O. *et al.* Reconstituted human corneal epithelium: a new alternative to the Draize eye test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and

- cosmetic products. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **20**, 499-512, (2006).
- 16 Sharpe, R. The Draize test--motivations for change. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **23**, 139-143, (1985).
- 17 Curren, R. D. & Harbell, J. W. In vitro alternatives for ocular irritation. *Environmental health perspectives* **106 Suppl 2**, 485-492, (1998).
- 18 Adriaens, E. *et al.* Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. *Archives of toxicology* **88**, 701-723, (2014).
- 19 York, M. & Steiling, W. A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. *Journal of applied toxicology : JAT* **18**, 233-240, (1998).
- 20 Lahl, U. & Hawxwell, K. A. REACH--the new European chemicals law. *Environmental science & technology* **40**, 7115-7121, (2006).
- 21 Prinsen, M. K. The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **20**, 78-81, (2006).
- 22 Luechtefeld, T. *et al.* Analysis of Draize eye irritation testing and its prediction by mining publicly available 2008-2014 REACH data. *ALTEX Alternatives to animal experimentation* **33**, 123-134, (2016).
- 23 Weil, C. S. & Scala, R. A. Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicology and applied pharmacology* **19**, 276-360, (1971).
- 24 Cormier, E. M. *et al.* Determination of the intra- and interlaboratory reproducibility of the low volume eye test and its statistical relationship to the Draize eye test. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **23**, 156-161, (1996).
- 25 European Parliament, C. o. t. E. U. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. 59-209, (2009).
- 26 Rovida, C. & Hartung, T. Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t(4)). *ALTEX Alternatives to animal experimentation* **26**, 187-208, (2009).
- 27 Wilson, S. L., Ahearne, M. & Hopkinson, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology* **327**, 32-46, (2015).
- 28 OECD. *Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.* (OECD Publishing, 2009).
- 29 OECD. *Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.* (OECD Publishing, 2013).

- 30 Piehl, M., Gilotti, A., Donovan, A., DeGeorge, G. & Cerven, D. Novel cultured porcine corneal irritancy assay with reversibility endpoint. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **24**, 231-239, (2010).
- 31 Piehl, M., Carathers, M., Soda, R., Cerven, D. & DeGeorge, G. Porcine Corneal Ocular Reversibility Assay (PorCORA) predicts ocular damage and recovery for global regulatory agency hazard categories. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **25**, 1912-1918, (2011).
- 32 Luepke, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **23**, 287-291, (1985).
- 33 Luepke, N. P. & Kemper, F. H. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology* **24**, 495-496, (1986).
- 34 OECD. *Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants*. (OECD Publishing, 2009).
- 35 Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. *Evaluation of In Vitro Test Methods to Identify Ocular Corrosives and Severe Irritants*, <<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/ocular/in-vitro/index.html>> (2006).
- 36 Alepee, N. *et al.* Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the SkinEthic reconstituted human corneal epithelium test method for the prediction of eye irritation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **27**, 1476-1488, (2013).
- 37 Malkinson, F. D. Advances in modern toxicology, vol 4, dermatotoxicology and pharmacology. *Archives of Dermatology* **114**, 469-469, (1978).
- 38 Klaassen, C. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Eighth Edition: The Basic Science of Poisons, Eighth Edition*. (McGraw-Hill Education, 2013).
- 39 McConnell, H. M. *et al.* The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* **257**, 1906-1912, (1992).
- 40 Spielmann, H. *et al.* The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **12**, 305-327, (1998).
- 41 Spielmann, H. *et al.* A study on UV filter chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **26**, 679-708, (1998).
- 42 Spielmann, H. *et al.* Results of a validation study in Germany on two in vitro alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **24**, 741-858, (1996).
- 43 OECD. *Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants*. (OECD Publishing, 2012).
- 44 Schmid, R. *et al.* In Vivo-Like Culture Conditions in a Bioreactor Facilitate Improved Tissue Quality in Corneal Storage. *Biotechnology journal* **13**, (2018).

- 45 Groeber, F. *Etablierung eines vaskularisierten Hautäquivalents* Dissertation thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, (2014).
- 46 Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences* **16**, 5517-5527, (2015).
- 47 Sun, T., Jackson, S., Haycock, J. W. & MacNeil, S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *Journal of Biotechnology* **122**, 372-381, (2006).
- 48 Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J. & Nakatsuji, T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* **211**, 1052-1054, (1981).
- 49 Reichl, S., Bednarz, J. & Muller-Goymann, C. C. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *The British journal of ophthalmology* **88**, 560-565, (2004).
- 50 Spielmann, H. *et al.* The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **35**, 559-601, (2007).
- 51 Kaluzhny, Y. *et al.* Development of the EpiOcular(TM) eye irritation test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in response to the requirements of the EU cosmetics directive and REACH legislation. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **39**, 339-364, (2011).
- 52 Pepic, I., Lovric, J., Cetina-Cizmek, B., Reichl, S. & Filipovic-Grcic, J. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models. *Drug discovery today* **19**, 31-44, (2014).
- 53 OECD. *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method.* (OECD Publishing, 2013).
- 54 OECD. *Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (Rhe) Test Method.* (OECD Publishing, 2014).
- 55 Alepee, N. *et al.* A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* **24**, 257-266, (2010).
- 56 Kojima, H. *et al.* A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24. *Journal of applied toxicology : JAT* **34**, 766-774, (2014).
- 57 Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. & Hata, K. Establishment of a new in vitro test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **27**, 2184-2192, (2013).
- 58 Poumay, Y. *et al.* A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Archives of dermatological research* **296**, 203-211, (2004).

- 59 Jung, K. M. *et al.* A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **25**, 403-410, (2011).
- 60 Yamaguchi, H., Kojima, H. & Takezawa, T. Vitrigel-eye irritancy test method using HCE-T cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **135**, 347-355, (2013).
- 61 European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing. *EURL ECVAM, status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches (2013-April 2014)*, <<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-status-report-development-validation-and-regulatory-acceptance-alternative-2>> (2014).
- 62 Pfannenbecker, U. *et al.* Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular reconstituted human tissue test method for the prediction of eye irritation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **27**, 619-626, (2013).
- 63 Schoop, V. M., Mirancea, N. & Fusenig, N. E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* **112**, 343-353, (1999).
- 64 Kojima, H. *et al.* Validation study of the in vitro skin irritation test with the LabCyte EPI-MODEL24. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **40**, 33-50, (2012).
- 65 Takezawa, T. *et al.* [Development of novel cell culture systems utilizing the advantages of collagen vitrigel membrane]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **130**, 565-574, (2010).
- 66 Griffith, M. *et al.* Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* **286**, 2169-2172, (1999).
- 67 Alaminos, M. *et al.* Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**, 3311-3317, (2006).
- 68 Proulx, S. *et al.* Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. *Molecular vision* **16**, 2192-2201, (2010).
- 69 Giasson, C. J., Deschambeault, A., Carrier, P. & Germain, L. Adherens junction proteins are expressed in collagen corneal equivalents produced in vitro with human cells. *Molecular vision* **20**, 386-394, (2014).
- 70 Xu, Y. G. *et al.* Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Molecular vision* **14**, 2180-2189, (2008).
- 71 Geggel, H. S., Friend, J. & Thoft, R. A. Collagen gel for ocular surface. *Investigative ophthalmology & visual science* **26**, 901-905, (1985).
- 72 Fagerholm, P. *et al.* Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials* **35**, 2420-2427, (2014).

- 73 Bell, E., Ivarsson, B. & Merrill, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1274-1278, (1979).
- 74 Liu, Y. *et al.* A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**, 1869-1875, (2006).
- 75 Calderon-Colon, X. *et al.* Structure and properties of collagen vitrigel membranes for ocular repair and regeneration applications. *Biomaterials* **33**, 8286-8295, (2012).
- 76 Mi, S., Chen, B., Wright, B. & Connon, C. J. Plastic compression of a collagen gel forms a much improved scaffold for ocular surface tissue engineering over conventional collagen gels. *Journal of biomedical materials research. Part A* **95**, 447-453, (2010).
- 77 Ang, L. P. *et al.* The development of a serum-free derived bioengineered conjunctival epithelial equivalent using an ultrathin poly(epsilon-caprolactone) membrane substrate. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**, 105-112, (2006).
- 78 Bartok, M., Gabel, D., Zorn-Kruppa, M. & Engelke, M. Development of an in vitro ocular test system for the prediction of all three GHS categories. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **29**, 72-80, (2015).
- 79 Engelke, M. *et al.* A human hemi-cornea model for eye irritation testing: quality control of production, reliability and predictive capacity. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **27**, 458-468, (2013).
- 80 Suuronen, E. J. *et al.* Innervated human corneal equivalents as in vitro models for nerve-target cell interactions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 170-172, (2004).
- 81 OECD. *Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.* (OECD Publishing, 2017).
- 82 OECD. *Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage.* (OECD Publishing, 2015).
- 83 Linke, K. *et al.* Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue engineering* **13**, 2699-2707, (2007).
- 84 Hansmann, J., Groeber, F., Kahlig, A., Kleinhans, C. & Walles, H. Bioreactors in tissue engineering - principles, applications and commercial constraints. *Biotechnology journal* **8**, 298-307, (2013).
- 85 Benson, K., Cramer, S. & Galla, H. J. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids and barriers of the CNS* **10**, 5, (2013).
- 86 Groeber, F. *et al.* A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation. *ALTEX Alternatives to animal experimentation* **33**, 415-422, (2016).

- 87 Groeber, F. *et al.* Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **36**, 254-261, (2016).
- 88 Lotz, C. *et al.* Cross-linked Collagen Hydrogel Matrix Resisting Contraction To Facilitate Full-Thickness Skin Equivalents. *ACS applied materials & interfaces* **9**, 20417-20425, (2017).
- 89 Schmid Freia F., S. T., Klos Michael, Schuberthan Wolfgang, Walles Heike, Hansmann Jan, and Groeber Florian K. Applicability of a Dual-Arm Robotic System for Automated Downstream Analysis of Epidermal Models. *Applied In Vitro Toxicology* **2**, 118-125, (2016).
- 90 Groeber, F. *et al.* Impedance spectroscopy for the non-destructive evaluation of in vitro epidermal models. *Pharmaceutical research* **32**, 1845-1854, (2015).
- 91 Nishida, K. *et al.* A gene expression profile of human corneal epithelium and the isolation of human keratin 12 cDNA. *Investigative ophthalmology & visual science* **37**, 1800-1809, (1996).
- 92 Pappa, A., Estey, T., Manzer, R., Brown, D. & Vasiliou, V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *The Biochemical journal* **376**, 615-623, (2003).
- 93 Javadi, M. A., Feizi, S., Jamali, H. & Mirbabae, F. Deep anterior lamellar keratoplasty using the big-bubble technique in keratoconus. *Journal of ophthalmic & vision research* **4**, 8-13, (2009).
- 94 Juhlin, L., Magnoldo, T. & Darmon, M. Expression of loricrin in skin disorders. *Acta dermato-venereologica* **72**, 407-409, (1992).
- 95 Tong, L. *et al.* Expression and regulation of cornified envelope proteins in human corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**, 1938-1946, (2006).
- 96 Murphy, G. F., Flynn, T. C., Rice, R. H. & Pinkus, G. S. Involucrin expression in normal and neoplastic human skin: a marker for keratinocyte differentiation. *The Journal of investigative dermatology* **82**, 453-457, (1984).
- 97 Ren, R. *et al.* Human primary corneal fibroblasts synthesize and deposit proteoglycans in long-term 3-D cultures. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**, 2705-2715, (2008).
- 98 Chapman, J. A. The staining pattern of collagen fibrils. I. An analysis of electron micrographs. *Connective tissue research* **2**, 137-150, (1974).
- 99 Gain, P. *et al.* Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol* **134**, 167-173, (2016).
- 100 Li, W. *et al.* A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 614-620, (2007).
- 101 Nagymihaly, R., Vereb, Z., Facsko, A., Moe, M. C. & Petrovski, G. Effect of Isolation Technique and Location on the Phenotype of Human Corneal Stroma-Derived Cells. *Stem cells international* **2017**, 9275248, (2017).

- 102 Sharifi, A. M., Darabi, R. & Jadidi, K. Isolation, culture, characterization and optimization of human corneal stem cells. *Biocell* **34**, 53-55, (2010).
- 103 Tanifuji-Terai, N., Terai, K., Hayashi, Y., Chikama, T. & Kao, W. W. Expression of keratin 12 and maturation of corneal epithelium during development and postnatal growth. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**, 545-551, (2006).
- 104 Ouyang, H. *et al.* WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature* **511**, 358-361, (2014).
- 105 Gopakumar, V., Chatterjee, N., Parameswaran, S., Nirmala, S. & Krishnakumar, S. In vitro transdifferentiation of human skin keratinocytes to corneal epithelial cells. *Cytotherapy* **18**, 673-685, (2016).
- 106 Swamynathan, S. K. Ocular surface development and gene expression. *Journal of ophthalmology* **2013**, 103947, (2013).
- 107 Shiraishi, A. *et al.* Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer. *Investigative ophthalmology & visual science* **39**, 2554-2561, (1998).
- 108 Nakamura, T. *et al.* Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 549-556, (2001).
- 109 Nithya, S., Radhika, T. & Jeddy, N. Loricrin - an overview. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* **19**, 64-68, (2015).
- 110 Bikle, D. D., Ng, D., Tu, C. L., Oda, Y. & Xie, Z. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Molecular and cellular endocrinology* **177**, 161-171, (2001).
- 111 Denda, M., Fuziwara, S. & Inoue, K. Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis. *The Journal of investigative dermatology* **121**, 362-367, (2003).
- 112 Bikle, D. D., Xie, Z. & Tu, C. L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert review of endocrinology & metabolism* **7**, 461-472, (2012).
- 113 Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-1058, (2007).
- 114 Vicanova, J. *et al.* Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *The Journal of investigative dermatology* **111**, 97-106, (1998).
- 115 Torma, H. Regulation of keratin expression by retinoids. *Dermato-endocrinology* **3**, 136-140, (2011).
- 116 Hohl, D., Lichti, U., Breikreutz, D., Steinert, P. M. & Roop, D. R. Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *The Journal of investigative dermatology* **96**, 414-418, (1991).
- 117 Hassell, J. R. & Birk, D. E. The molecular basis of corneal transparency. *Experimental eye research* **91**, 326-335, (2010).

- 118 Grobe, G. M. & Reichl, S. Characterization of vitamin C-induced cell sheets formed from primary and immortalized human corneal stromal cells for tissue engineering applications. *Cells Tissues Organs* **197**, 283-297, (2013).
- 119 Yang, C. *et al.* The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* **18**, 103-119, (2004).
- 120 Patel, S., McLaren, J., Hodge, D. & Bourne, W. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 333-339, (2001).
- 121 West-Mays, J. A. & Dwivedi, D. J. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**, 1625-1631, (2006).
- 122 Levis, H. J. *et al.* Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation. *PLoS One* **7**, e50993, (2012).
- 123 Vrana, N. E. *et al.* EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **18**, 1527-1545, (2007).
- 124 Guidry, C. & Grinnell, F. Heparin modulates the organization of hydrated collagen gels and inhibits gel contraction by fibroblasts. *The Journal of cell biology* **104**, 1097-1103, (1987).
- 125 Guidry, C. & Grinnell, F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *Journal of cell science* **79**, 67-81, (1985).
- 126 Grinnell, F. & Lamke, C. R. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. *Journal of cell science* **66**, 51-63, (1984).
- 127 Yamato, M., Adachi, E., Yamamoto, K. & Hayashi, T. Condensation of collagen fibrils to the direct vicinity of fibroblasts as a cause of gel contraction. *Journal of biochemistry* **117**, 940-946, (1995).
- 128 Ehrlich, H. P. & Rajaratnam, J. B. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an in vitro model of wound contraction. *Tissue Cell* **22**, 407-417, (1990).
- 129 Ghezzi, C. E., Marelli, B., Omenetto, F. G., Funderburgh, J. L. & Kaplan, D. L. 3D Functional Corneal Stromal Tissue Equivalent Based on Corneal Stromal Stem Cells and Multi-Layered Silk Film Architecture. *PLoS One* **12**, e0169504, (2017).
- 130 Griffith, M. *et al.* Artificial human corneas: scaffolds for transplantation and host regeneration. *Cornea* **21**, S54-61, (2002).
- 131 Griffith, M., Alarcon, E. I. & Brunette, I. Regenerative approaches for the cornea. *Journal of internal medicine* **280**, 276-286, (2016).
- 132 Kowtharapu, B. S., Murin, R., Junemann, A. G. M. & Stachs, O. Role of Corneal Stromal Cells on Epithelial Cell Function during Wound Healing. *International journal of molecular sciences* **19**, (2018).
- 133 Nagae, S., Lichti, U., De Luca, L. M. & Yuspa, S. H. Effect of retinoic acid on cornified envelope formation: difference between spontaneous envelope

- formation in vivo or in vitro and expression of envelope competence. *The Journal of investigative dermatology* **89**, 51-58, (1987).
- 134 Kruse, F. E. & Tseng, S. C. Retinoic acid regulates clonal growth and differentiation of cultured limbal and peripheral corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* **35**, 2405-2420, (1994).
- 135 Zorn-Kruppa, M. *et al.* Determining the Depth of Injury in Bioengineered Tissue Models of Cornea and Conjunctiva for the Prediction of All Three Ocular GHS Categories. *PLoS One* **9**, e114181, (2014).
- 136 Tandon, R. *et al.* Assessment of the eye irritation potential of chemicals: A comparison study between two test methods based on human 3D hemi-cornea models. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **30**, 561-568, (2015).
- 137 Yamaguchi, H., Kojima, H. & Takezawa, T. Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals. *Journal of applied toxicology : JAT* **36**, 1025-1037, (2016).
- 138 Schmitz, T. *et al.* Nanostructured TiN-Coated Electrodes for High-Sensitivity Noninvasive Characterization of in Vitro Tissue Models. *ACS Applied Nano Materials* **1**, 2284-2293, (2018).
- 139 Burton, A. B., York, M. & Lawrence, R. S. The in vitro assessment of severe eye irritants. *Food and cosmetics toxicology* **19**, 471-480, (1981).
- 140 Van Goethem, F. *et al.* Prevalidation of a new in vitro reconstituted human cornea model to assess the eye irritating potential of chemicals. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **20**, 1-17, (2006).
- 141 Adriaens, E. *et al.* CON4EI: Selection of the reference chemicals for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **44**, 44-48, (2017).
- 142 Hayashi, R. *et al.* Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* **531**, 376-380, (2016).
- 143 Zhong, X. *et al.* Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nature communications* **5**, 4047, (2014).

8 Danksagungen

Zunächst bin ich Frau Prof. Dr. Heike Walles zu Dank verpflichtet für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin schreiben zu dürfen. Zugleich gilt Ihr mein herzlicher Dank für ein stets offenes Ohr sowie klugen und weitsichtigen Ratschlägen. Sie hat mich gefördert und gefordert, immer einen positiven Einfluss auf meine Dissertation gehabt und mich durch das Promotionsverfahren bis zum Kolloquium begleitet. Darüber hinaus gebührt Ihr großer Dank, dass sie den Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin und das Translationszentrum für Regenerative Therapien zu einer echten Forschungsgemeinschaft geformt und ein produktives Forschungsumfeld für das Tissue Engineering geschaffen hat.

Mein Dank gilt ebenso den Herren Dr. Jörg Teßmar und Dr. Bart de Wever für ihre hilfreiche Beratung während des Dissertationsprozesses und für die fachliche Prüfung meiner Dissertation.

Meinem Betreuer Dr. Florian Groeber-Becker habe ich vorzüglich zu danken für seine intensiven Bemühungen um meine berufliche und persönliche Weiterentwicklung am Fraunhofer Institut. Den Mitgliedern der Forschungsgruppe „Haut“ Freia Schmid, Christa Albert, Lisa Engelhardt, Christoph Malkmus, Ramona Seliger darf ich einen besonderen Dank sagen, weil sie sich jeweils die Zeit nahmen, meine Forschungsergebnisse zu besprechen, mir mit Rat und Tat zur Seite standen, im Labor und am Schreibprozess regen Anteil nahmen und mit Sympathie meine Begeisterung für dieses Forschungsvorhaben zuverlässig unterstützten.

Die 4-jährige Arbeit an dieser Dissertation war für mich eine intensive wissenschaftliche, aber auch persönlichkeitsbildende Erfahrung, vor allem auch wegen der großartigen Mitarbeiter und der hervorragenden Atmosphäre im Institut. Herzlich dankend hervorheben möchte ich Matthias Schweinlin und Corinna Rosenbaum für ihren zuverlässigen Rat und ihre Hilfe; ebenso Antje Appelt-Menzel für meine Sicherheit, PD. Dr. Marco Metzger, Dr. Jan Hansmann, PD. Dr. Oliver Pullig, Dr. Maria Steinke und Dr. Joachim Nickel für die gute Zusammenarbeit und anregenden Erfahrungsaustausch; und ebenfalls Anna Stefl, Özlem Elbert und Tesda Barthel für die hervorragende Organisation und Unterstützung in allen praktischen Bereichen und nicht zuletzt Moni und Andrea für die sauberen Werkzeuge und die rechte Disziplin.

Ebenfalls großen Dank schulde ich auch Christoph Rucker, David Fecher, Anna Schliermann, Tobias Weigel, Thomas Schwarz, Ram Kumar Mohani, Claudia Siverino, Markus Mühlemann, Claudia Göttlich, Sebastian Schürlein, Sebastian Kress, Daniela Zdzieblo, Marc Möllemann, Tobias Schmitz, Bastian Christ, Sabine Adam, Angela Rossi, Anup James-Shirley, Sabine Gätzner, Alan Palus, Davide Confaleroni, Holger Kirch, Alevtina Cubukova, Kirsten Langenbrink, Katalin und Tamás Herczeg und Lena Nelke für stets gute nützliche Hinweise und tatkräftige Unterstützung. Ein Merci vielmals den genannten

Personen und allen, die ich nicht erwähnt habe, für unvergessliche Gespräche in einer für mich wichtigen Reifungsphase.

Neben den Arbeitskollegen möchte insbesondere meinen Freunden Charlotte Wermser, Jonas Leinweber, Tobias Schmidt, Tonja Schwenner und Michael Reuster, danken, die in guten wie in schlechten Zeiten immer an meiner Seite waren und für Lebensfreude und Rückhalt sorgten.

Nicht zuletzt sei meinen Eltern, Undine und Heinrich, gedankt, dass sie ein Goethe zugeschriebenes Paradox scheinbar mühelos in meinem Charakter angelegt haben: „Zwei Dinge sollen Kinder von ihren Eltern bekommen: Wurzeln und Flügel“; und Chapeau meinem Bruder Martin, der mir als Pionier auf dem Weg durch Bildung und Wissenschaft mutig vorangeschritten ist.

Diese Dissertation wurde durch die Finanzierung von Evonik Industries ermöglicht.

9 Appendix

9.1 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Development of an eye irritation test to identify all GHS categories of eye irritation“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of an examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

9.1.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entwicklung eines Augenirritations-tests zur Identifikation aller GHS-Kategorien für den Endpunkt Augenreizung“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

9.2 Publikationsliste

1. **Lotz C.** 1., Engelhardt L., Schmid F. F., Hansmann J., Walles H., Groeber-Becker F., “Replacing the Draize eye test: Impedance spectroscopy as a 3R method to discriminate between all GHS categories for eye irritation”, 2018, Nature Scientific Reports (Submitted).
2. **Lotz C.** and Schmid F. F., Oechsle E., Monaghan MG., Walles H., Groeber-Becker F., “Cross-linked Collagen Hydrogel Matrix Resisting Contraction To Facilitate Full-Thickness Skin Equivalents.” 2016, ACS Applied Material Interfaces.
3. **Lotz C.**, Schmid F. F., Rossi A., Kurdyn S., Kampik D., De Wever B., Walles H., Groeber F. K.. “Alternative methods for the replacement of eye irritation testing.”, 2016, ALTEX
4. Schmid R. and Tarau I., Rossi A., Leonhardt S., Schwarz T., Schuerlein S., **Lotz C.**, Hansmann J.. “In Vivo-Like Culture Conditions in a Bioreactor Facilitate Improved Tissue Quality in Corneal Storage.”, 2017, Biotechnology Journal.
5. Schmitz T., Schweinlin M., Kollhoff R., Engelhardt L., **Lotz C.**, Groeber-Becker F., Walles H., Metzger M., and Hansmann J. “Nanostructured TiN-Coated Electrodes for High-Sensitivity Noninvasive Characterization of in Vitro Tissue Models”, 2018,
6. Lichter J., Bock U., **Lotz C.**, Groeber F., Blömeke B., “Functional expression of N-acetyltransferase 1 in differentiated human skin keratinocytes” 2017, British Journal of Dermatology.
7. Schweinlin M., Rossi A., Lodes N., **Lotz C.**, Hackenberg S., Steinke M., Walles H., Groeber F.. “Human barrier models for the in vitro assessment of drug delivery.”, 2017, Drug Delivery and Translational Research.

9.3 Curriculum Vitae

