

Aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Leitung: Prof. Dr. med. M. Böck

**Stabilität der epitheliotropen Potenz von Serum vor und nach
Kryokonservierung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Kai Reiner Fischer
aus Leinach

Würzburg, 04.06.2010

Referent: Prof. Dr. med. Markus Böck
Koreferent: Prof. Dr. med. Gerd Geerling
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2011

Der Promovend ist Zahnarzt

Meinen Großeltern Agnes und Karl

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destilata
AT	Augentropfen
AT ₁₀₀	100% Serumaugentropfen
AT ₅₀	50% Serumaugentropfen
AT ₂₀	20% Serumaugentropfen
bzw.	beziehungsweise
BSS	balanced salt solution / Spüllösung
BUT	Tränenfilmaufreißzeit
°C	Grad Celsius
ca.	circa
d	Tag
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dt.	deutsch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
et al.	et altera
FBS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Erdanziehungskraft
h	Stunde
HCE	humane Hornhautepithelzellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H ₂ O	Wasser
IgA	Immunglobulin A
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
M	Molar

Mon	Monat
MW	Mittelwert
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikro Molar
PBS	Phosphatpuffer
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec.	Sekunde(n)
STABW	Standartabweichung
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
Vit.	Vitamin
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die funktionelle Einheit der Augenoberfläche und des Tränen-systems	1
1.2. Eigenserum zur Therapie der Augenoberflächenerkrankungen	4
1.3. Das trockene Auge – Pathophysiologie, Klinik und aktuelle Therapie	6
1.4. Fragestellung dieser Arbeit	9
2. Materialien und Methoden	12
2.1. Zellkultur	12
2.1.1. Beschreibung der verwendeten Zelllinie	12
2.1.2. Zellkulturbedingungen	12
2.1.3. Subkultivierung und Züchtung	13
2.1.4. Bestimmung der Zellzahl	13
2.2. Probanden	14
2.3. Serumgewinnung und Lagerung	14
2.4. Biochemische Charakterisierung der Serum-Proben	15
2.4.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	15
2.4.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	17
2.4.3. Photometrie	18
2.4.4. Turbidimetrie	19
2.4.5. Restzellzahlbestimmung	19
2.5. Funktionelle Tests	20
2.5.1. ATP-Assay	20
2.5.2. Kolonie-Dispersions-Assay	21
2.5.3. Scratch-Wound-Assay (Gesamtwundheilung)	22
2.6. Sterilkontrolle	22
2.7. Statistische Tests	23
2.8. Verwendete Lösungen und Ansätze	24
2.9. Verwendete Geräte und Materialien	25
3. Ergebnisse	27
3.1. Biochemische Charakterisierung der Serum-Proben	27
3.1.1. Albumin	27
3.1.2. Gesamtprotein	28
3.1.3. Vitamin A	29
3.1.4. Vitamin E	30
3.1.5. Immunglobulin A	30

3.1.6. EGF	31
3.1.7. Fibronectin	32
3.1.8. Restzellzahl	32
3.2. Funktionelle Tests	33
3.2.1. ATP-Assay	33
3.2.2. Kolonie-Dispersions-Assay	34
3.2.3. Scratch-Wound-Assay (Gesamtwundheilung)	36
3.3. Sterilkontrolle	38
4. Diskussion	39
5. Zusammenfassung	45
6. Literaturverzeichnis	47

1. Einleitung

1.1. Die funktionelle Einheit der Augenoberfläche und des Tränensystems

Die Zellen der Kornea (dt.: Hornhaut) und der Konjunktiva (dt.: Bindehaut), die Tränendrüsen mit dem von ihnen produzierten Tränenfilm sowie die Augenlider bilden zusammen eine funktionelle Einheit. Zu dieser Einheit zählen auch sensorische und motorische Nerven, welche die Tränensekretion, die beteiligten Drüsen und den Lidschlag überwachen und stimulieren. Im Folgenden soll besonders auf die Hornhaut und den Tränenfilm eingegangen werden.

Die Kornea ist das durchsichtige Fenster des Bulbus oculi und ca. 0,5 mm stark. Sie ist am Limbus wie ein Uhrglas in die Sklera eingefalzt. Die normale menschliche Hornhaut ist meist horizontal elliptisch und sphärisch gewölbt. Im Zentrum ist die Hornhaut dünner als am Rand. Sie besteht aus drei Schichten: Epithel, Stroma (mit Bowman-Lamelle) und Endothel (mit Descemet-Lamelle).

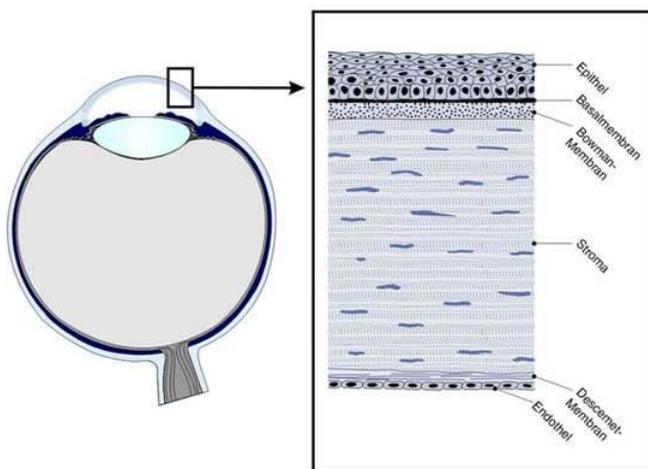


Abb. 1: Aufbau der Cornea
(Quelle: http://www.medicin.uni-tuebingen.de/uktmedia/Einrichtungen/Kliniken/Augenklinik/Augenheilkunde_I-p-1377/Bild_Archiv-p-1379/Hornhautsprechstunde/hh_1_425-width-396-height-552.jpg)

Das Epithel der Hornhaut ist ein geschichtetes, unverhorntes Plattenepithel aus ungefähr sechs Schichten Zellen, welche durch Desmosomen verbunden sind. Die oberste Zellreihe ist durch Tight junctions verbunden und bildet somit eine Diffusionsbarriere. Das Epithel zählt zu den empfindlichsten Oberflächen des Körpers und wird von basal erneuert. Der Zellnachschieb wird durch die am

Limbus sitzenden Stammzellen gesichert. Wird nur das Epithel verletzt, heilt dieses rasch und ohne Narbenbildung aus.

Das Stroma ist mit 90% der Hauptanteil der Kornea. Es besteht aus Kollagenfibrillen, Proteoglykanen, Wasser und Fibroblasten. Die Fibroblasten oder Keratozyten sind für den Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix verantwortlich. Zwischen Epithel und Stroma liegt die zellfreie, lichtmikroskopisch homogene und strukturlose Bowman-Lamelle. Die Keratozyten liegen zwischen Lamellen aus Kollagenfibrillen. Diese Lamellen wiederum enthalten die Proteoglykane, u.a. das Kornea-spezifische Lumican, die der Wasserretention dienen.

Die unterste Schicht, das Endothel, wird durch eine flache Zellschicht gebildet und fungiert als lückenlose Bedeckung der Hornhautoberfläche. Das Endothel bildet eine sehr dicke Basallamina, die sog. Descemet-Lamelle, welche an das Stroma grenzt und maßgeblich an der Regulation des Stroma-Wasserhaushalts beteiligt, der unentbehrlich für die Aufrechterhaltung der Transparenz der Kornea ist [Lüllmann-Rauch 2003].

Der Tränenfilm ist die von der Tränenflüssigkeit gebildete Flüssigkeitsschicht, die den vorderen Teil des Augapfels bedeckt. Der Tränenfilm dient dem Schutz vor Fremdkörpern und bildet eine Gleitschicht für das obere Augenlid. Seine Bestandteile sorgen für die Ernährung der äußeren Schichten der Kornea, die keine Blutgefäße enthält und somit über Diffusion ernährt wird. Durch seine antimikrobiellen Bestandteile schützt der Tränenfilm den vorderen Augapfel vor Infektionen. Schließlich sorgt er für eine glatte und glänzende Hornhautoberfläche und ist somit wesentlich an der optischen Funktion der Hornhaut beteiligt [Brewitt und Zierhut 2001].

Wolff [1946] beschrieb als erster eine Einteilung des Tränenfilms in drei Teile. Diese einfache Einteilung ist heute zwar nicht mehr ganz haltbar, ist jedoch aus diagnostischer und therapeutischer Sicht nützlich. Die traditionellen Grenzen zwischen den Schichten sind eher fließend bis nicht vorhanden.

Die Lipidschicht ist die oberste Schicht des Tränenfilms und bis zu 0,4 µm dick. Sie erfüllt drei wichtige Stabilisierungsfunktionen für den Tränenfilm:

1. Sie verringert die Verdunstung der wässrigen Schicht um den Faktor 5 bis 20.

2. Sie verhindert das Aufreißen des Tränenfilms durch eine zu starke Vermischung mit Lipiden aus den Talgdrüsen.

3. Sie hält die Dicke des Tränenfilms durch Herabsetzung der Oberflächenspannung bei Lidöffnung und der damit verbundenen Verstärkung der wässrigen Schicht konstant.

Die Lipidschicht besteht aus Cholesterin, Cholesterinestern, Triglyzeriden und Phospholipiden. Diese werden in den Meibom-Drüsen gebildet und im Bereich der Lidkante abgegeben. Nur aufgrund eines ausgewogenen Mischungsverhältnisses der Einzelbestandteile des Meibom Sekretes sind die Bestandteile flüssig. Die Lipidschicht stellt einen Duplexfilm dar, d.h. die polaren Lipide breiten sich schnell auf der wässrigen Phase aus, während sich die nicht polaren Lipide langsamer verteilen und die polaren überziehen. Störungen der Zusammensetzung des Sekrets der Meibom-Drüsen treten v.a. im Rahmen einer chronischen Entzündung auf. Dies führt zu einer verringerten mechanischen Schutzfunktion des Tränenfilms [Holly et. al 1977, Kaercher und Welt 1998].

Die wässrige Schicht befindet sich zwischen der Lipid- und der Muzinschicht. Sie besteht zu 98% aus Wasser, bildet mit einer Dicke von 38 – 40 µm den größten Anteil des Tränenfilms und wird von der Haupttränendrüse und den akzessorischen Tränendrüsen gebildet. Neben Wasser enthält sie Glucose, Sauerstoff und weitere Nährstoffe für die Hornhaut. In der wässrigen Schicht sind zahlreiche Komponenten der Immunabwehr lokalisiert. Das wichtigste Protein ist das basische Lysozym, welches durch Spaltung von beta-1-4-glycosidischen Bindungen das Peptidoglycangerüst der Bakterienzellwand zerstört und somit antibakteriell wirkt. Gemeinsam mit dem sauren Albumin bildet es ein Puffersystem für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes. Neben Lysozym spielt Lactoferrin eine wichtige Rolle in der Immunabwehr da es einerseits als Protease, andererseits als Eisen-bindendes Protein fungiert, wodurch die Vermehrung von Bakterien verhindert wird. Außerdem enthält die wässrige Schicht Immunglobuline v.a. IgA, Vitamin A und Wachstumsfaktoren wie Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. Epidermal Growth Factor, EGF) und Fibronectin.

Die Muzinschicht geht in die wässrige Schicht des Tränenfilms über und grenzt an das Epithel der Kornea. Sie ist etwa 0,02 - 0,05 µm dick und wird in den

Becherzellen der Bindehaut, sowie auch in den Epithelien der Horn- und Bindehaut gebildet [Dilly 1986]. Erst durch die Muzine und die damit verbundenen Protein-Muzin-Komplexe kann eine Benetzung des hydrophoben Korneaepithels mit Wasser erreicht werden. Hierfür entscheidend ist die Haftung der Muzine an die Glykokalix des Epithels [Moore und Tiffany 1981].

1.2. Eigenserum zur Therapie der Augenoberflächenerkrankungen

Tränen sind für die primäre Versorgung des Hornhautepithels verantwortlich und transportieren bei Verletzungen Wachstumsfaktoren zu den Epithelzellen. Hieraus folgt, dass ein ausreichender Tränenfluss unabdingbar für die regelrechte Epithelialisation der Augenoberfläche ist. Durch einen reduzierten Tränenfluss im Sinne einer Keratoconjunctivitis Sicca z.B. im Rahmen einer chronischen Graft-versus-host Reaktion nach Stammzelltransplantation kann es zu persistierenden Defekten der Hornhaut kommen. Diese Defekte sind charakterisiert durch einen Untergang der Epithelzellen der Kornea und können mit einem Verlust an Becherzellen der Bindehaut sowie einer Störung der Muzinexpression assoziiert sein. Sie führen zu starken Schmerzen und eingeschränkter Sehfähigkeit. Patienten mit Korneadefekten können einen verringerten Tränenfluss oder eine herabgesetzte Empfindlichkeit der Neurone, z.B. viraler Genese, der Kornea besitzen [Yamada et al. 2008].

Die Therapie mit künstlichen Tränenersatzmitteln, Schutzbrillen, speziellen weichen Kontaktlinsen und dem Verschluss des Abflussweges der Tränenflüssigkeit gelten als Standardtherapie und kommen als erstes zum Einsatz. Bleibt der erwünschte Effekte jedoch aus, stellen Augentropfen (AT) aus Eigenserum einen relativ neuen Ansatz in der Therapie von Erkrankungen der Augenoberfläche (z. B. Stevens-Johnson-Syndrom) dar [Geerling et al. 2004]. Als Pionierarbeit kann hier die Studie von Fox et al. aus dem Jahr 1984 genannt werden. Fox behandelte Patienten mit Sjögren Syndrom mit Serum-AT. Vorteilhaft für die Verwendung von Serum-AT ist ihre biomechanische und biochemische Ähnlichkeit zur Tränenflüssigkeit (siehe Abb. 2). Sie können zur Benetzung, Reinigung und Ernährung der Augenoberfläche unkonserviert verwendet werden.

	Träne	Serum
pH-Wert	7,4	7,4
Osmolalität	298 ± 10	296
EGF (ng/ml)	0,2-3	0,5
TGF-β (ng/ml)	2-10	6-33
Vit. A (mg/ml)	0,02	46
Lysozym (mg/ml)	1,4 ± 0,2	6
IgA (µg/ml)	1190 ± 904	2
Fibronektin (µg/ml)	21	205

Tabelle 1: Vergleich der Inhaltsstoffe von humanen Tränen und Serum [Geerling et al. 1999]

Die wundheilungsfördernde Potenz der Serum-AT geht vermutlich von Fibronektin, Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor) und Vitaminen aus. Zahlreiche Studien haben mittlerweile auch klinisch den Wert dieser Therapieform belegt. In Zellkulturexperimenten unterstützte Serum die Proliferation, Migration und den intrazellulären Stoffwechsel humaner Hornhautepithelzellen besser als konservierte oder unkonservierte pharmazeutische Produkte [Geerling et al. 2001]. Eigenserum fördert zudem auch die Differenzierung von Hornhaut- und Bindehautepithelzellen [Liu et al. 2006].

Erste klinische Studien berichten über den erfolgreichen Einsatz von Eigenserum in der Therapie schwer trockener Augen und persistierender Epitheldefekte. Dabei wurden autologe Serum-AT mit unterschiedlichen Verfahren hergestellt und in verschiedenen Konzentrationen verwendet [Geerling et al. 2001]. Diese Herstellungsvariationen beeinflussen den biochemischen Charakter und damit die epitheliotrophe Wirkung der Serum-AT in-vitro [Herminghaus et al. 2004]. Ein optimiertes Herstellungsprotokoll (siehe 2.3.) wurde bereits erarbeitet [Liu et al. 2005]. Ob das Präparationsverfahren auch klinisch die epitheliotrophe Kapazität der Serum-AT beeinflusst, wurde bislang nicht untersucht. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass Serum-AT bei 4°C einen Monat und bei -20°C auch drei Monate gelagert werden

können und es zu keinem signifikanten Verlust an Zytokinen kommt [Tsubota et al. 1999].

Die relativ aufwendige individuelle Herstellung sowie die gesetzlichen Regularien (Herstellungserlaubnis nach § 13 des Arzneimittelgesetzes notwendig) schränken bisher die flächendeckende Versorgung der Patienten mit autologen Serumaugentropfen ein. Von Nachteil ist auch, dass durch den Verzicht auf Konservierungsstoffe bzw. Antibiotika potentiell die Gefahr einer bakteriellen Kontamination des autologen Blutproduktes bei längerer Verwendung der gleichen Tropfflasche besteht. Um dieses Risiko zu reduzieren, wird die Haltbarkeit der gekühlten Tropfen sehr kurz gewählt, was die Verfügbarkeit weiter einschränkt. Des Weiteren kann es im Rahmen der Herstellung oder Verwendung der AT zu einer Übertragung von Infektionskrankheiten auf Dritte kommen.

Der Nachweis der Funktionalität der Serumaugentropfen nach einer verlängerten Haltbarkeit von 6 Monaten Lagerungen bei -20° - diese Temperatur wird von den gängigen Haushaltsgefriereinheiten problemlos erreicht - könnte durch die seltenere Blutabnahmen die Logistik vereinfachen und somit die Versorgung der Patienten verbessern.

1.3. Das trockene Auge – Pathophysiologie, Klinik und aktuelle Therapie

„Das trockene Auge ist eine multifaktorielle Störung von Tränenfilm und Augenoberfläche, welche physisch-psychischem Unbehagen oder visueller Beeinträchtigung einhergeht. Inflammatorische Prozesse und ein hyperosmolarer Tränenfilm sind wichtige Faktoren, die mit dieser Krankheit assoziiert werden“,

so lautet die vereinfachte Definition des trockenen Auges der „Dry Eye Workshop Study Group (DEWS Steering Committee)“ aus dem Jahr 2005 [Jacobi et al. 2006].

Sicher ist das trockene Auge mit einer Prävalenz in entwickelten Ländern von ca. 15% eine der häufigsten okulären Erkrankungen, obwohl nur etwa 0,5% der Weltbevölkerung wegen eines trockenen Auges behandelt werden [American Academy of Ophthalmology 2003].

Das Krankheitsbild kann in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: die Erste ist verbunden mit dem Auftreten einer verminderten Tränenproduktion (quantitative Tränenfilminsuffizienz), dieser Komplex wird auch unter Keratoconjunctivitis sicca zusammengefasst, und die Zweite ist durch eine vermehrte Verdunstung des Tränenfilms (qualitative Tränenfilminsuffizienz oder evaporativ trockenes Auge) charakterisiert, häufig in Kombination mit einer Liderkrankung. Erstere ist weniger weit verbreitet.

A. Verminderte Tränenproduktion	B. Vermehrte Verdunstung des Tränenfilms
1. Sjögren-Syndrom	1. Verminderte Lipidphase des Tränenfilms
1.1. Primär	1.1. Primär (Distichiasis)
1.2. Sekundär (Rheumatoide Arthritis etc.)	1.2. Sekundär (Blepharitis etc.)
2. Non-Sjögren-Syndrom	2. Lidfunktionsstörung
2.1. Erkrankungen der Tränendrüse	3. Oberflächenveränderungen
2.1.1. Primär (kongenitale Alakrimie etc.)	3.1. Primär (Xerophthalmie)
2.1.2. Sekundär (HIV, Xerophthalmie etc.)	3.2. Sekundär (Allergie, Verbrennung, Operation)
2.2. Tränensekretionsbehinderung (Trachom etc.)	4. Kontaktlinsen, Umfeld („Office eye syndrome“)
2.3. ReflexhyPOSEKRETION (Kontaktlinse etc.)	

Tabelle 2: Klassifikation der Keratoconjunctivitis Sicca [nach Dogru et al. 2004]

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist das Krankheitsbild der Keratconjunctivitis sicca sehr umfangreich und komplex. In allen Fällen kommt es zu einer lokalen Entzündung, dem Anstieg von Zytokinen und Proteasen in der Tränenflüssigkeit, der Expression von Adhäsionsmolekülen durch das konjunktivale Epithel, sowie einer Infiltration der Bindehaut durch T-Zellen [Pflugfelder et al. 1999]. Während Patienten mit einer quantitativen Tränenfilminsuffizienz unter einer reflektorischen Hyposekretion leiden, kann es beim evaporativ trockenen Auge mit vermehrter Verdunstung sogar zu einer gesteigerten Tränenproduktion kommen [Schargus und Geerling 2009].

Trophische Prozesse im fortgeschrittenen Alter, hormonelle Fehlregulation (z.B. Androgenhaushalt), eine Therapie mit Anticholinergika, Zustand nach refraktiver Chirurgie (z.B. LASIK) und Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) können eine Störung der funktionellen Einheit der Augenoberfläche hervorbringen. So scheinen Androgene die Produktion und Sekretion von entzündungshemmenden Faktoren zu regulieren. Fällt der Androgenspiegel unter einen bestimmten Wert so kann die Konzentration von transformierendem

Wachstumsfaktor- β (TGF- β) abfallen und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, z.B. Interleukinen, nimmt zu [Dogru et al. 2004]. Die okuläre Oberfläche ist auf ein Gleichgewicht der Tränenkomponenten angewiesen. Entsteht ein Ungleichgewicht, kommt es - ähnlich dem verringerten Androgenspiegel - zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Die hyperosmolare Tränenflüssigkeit, d.h. sie enthält eine größere Anzahl gelöster Teilchen pro Volumeneinheit, wirkt ebenfalls als proinflammatorischer Stimulus. Es wird mehr Interleukin-1, -8, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Matrixmetalloproteinasen-9 (MMP-9) produziert und ausgeschüttet [Luo et al. 2003].

Symptome des trockenen Auges sind Trockenheit, Brennen, Juckreiz, Druck- und Fremdkörpergefühl im Auge sowie Rötung, Juckreiz und Schwellung der Lider.

Eine ausführliche Diagnostik und das Verständnis für die Pathogenese des trockenen Auges machen eine erfolgreiche Therapie erst möglich. Eine genaue Anamnese, Inspektion der Haut, des Auges mittels Spaltlampe sowie der Lider und klinische Tests wie die Bengalrosa- oder Fluoreszeinfärbung, der Schirmer-Test und die Tränenfilmaufreißzeit (Break-Up-Time, BUT) sind unentbehrlich für die Diagnosestellung und gezielte Therapie. Die Messung der Fluoreszeineinfärbung dient als Indikator der epithelialen Barrierefunktion und die Färbung mittels Bengalrosa gibt einen Hinweis auf den Epithelschaden. Während sich die genannten Tests v.a. mit der Augenoberfläche beschäftigen, wird mit Hilfe der Tränenfilmaufreißzeit, des Schirmer-Test, des Jones-Test und der Untersuchung des Tränenmeniskus die Funktionstüchtigkeit des Tränenfilms überprüft. Die BUT gibt Auskunft über die Stabilität des präkornealen Tränenfilms. Die Messung der Sekretionsleistung der Tränendrüse erfolgt durch den Schirmer-Test und den Jones-Test. Die Untersuchung des Tränenmeniskus dient als ein Indikator des Flüssigkeitspools an der Lidern. [Stolze 2001]

Die Patienten zeigen häufig einen sehr hohen Leidensdruck, deshalb muss akut eine Linderung der Symptome und Beschwerdefreiheit erreicht werden. Langfristig ist es das Therapieziel die Ursache auszuschalten. Die Wahl des geeigneten Therapeutikums sollte anhand der in Tabelle 1 dargestellten zwei Hauptgruppen mit deren Subtypen erfolgen, kann aber auch anhand der drei

Komponenten des Tränenfilms und des Schweregrades des Sicca-Syndroms vorgenommen werden.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über einige Therapieansätze gegeben. Am häufigsten und bei allen Ausprägungsgraden kommen künstliche Tränenersatzmittel zum Einsatz. Hier kann zwischen niedrig viskösen, z.B. Zellulosederivate, für leichte Erkrankungen und höher viskösen Mitteln, z.B. Hyaluronsäure, für moderate Formen unterschieden werden. Die Anwendung kann von anfangs 3- bis 5-mal täglich hin zu einer stündlichen Applikation schwanken. Autologe Serumaugentropfen werden v.a. bei der schweren Formen des Trockenen Auges angewandt. Besonders bei einer Störung der Lipidschicht ist die Pflege und Hygiene der Lidkanten unverzichtbar. Hierzu zählt die Applikation von heißen Kompressen, die Lidkantenmassage, eine lokale Antibiotikagabe und auch der Verzicht auf Kosmetika. Der Verschluss der Tränenpunkte, entweder temporär durch sog. Punctum-Plugs oder die permanente Verödung mittels Kauter, kann die Symptomatik der Keratoconjunctivitis sicca wirksam mindern. Zum Schutz der Augenoberfläche können auch sog. Weiche Verbandslinsen oder Skleralinsen, eingesetzt werden [Hanisch et al. 2005]. Eine antientzündliche und damit kausale Therapie stellt die Anwendung von 0,05% topischem Ciclosporin A oder Prednisolonacetat dar. Die Dauertherapie mit Ciclosporin A führt zu einer messbaren Reduktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen [Brignole et al. 2001]. Prednisolonacetat wirkt in beiden Formen des trockenen Auges, kann aber aufgrund der Nebenwirkung nur als „Stoßtherapie“ genutzt werden. Zukünftig versprechen Sekretogene, Hormon- und Antizytokintherapie einen deutlichen Fortschritt in der Therapie des trockenen Auges [Cursiefen et al. 2006].

1.4. Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Stabilität des wundheilungsfördernden Einflusses von Serum-Augentropfen in verschiedenen Verdünnungsstufen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen in-vitro mit Hilfe einer humanen Hornhautepithel-Zelllinie quantifiziert.

1) Kann die wundheilungsfördernde Wirkung von Serum-AT durch Lagerung bei +4°C oder -20°C erhalten bleiben (Stabilitätsnachweis)?

Serum-AT werden nicht nur bei akuten, sondern v.a. bei chronisch wiederkehrenden Erkrankungen des Auges eingesetzt und hier als Dauertherapie verwendet. Bei Nachweis einer stabilen Effektivität der Serum-AT würde eine solche Lagerung über sechs Monate bei -20°C die Möglichkeit bieten die Herstellungsfrequenz drastisch zu reduzieren. Dies würde den Gesamtherstellungsaufwand pro Patient und Jahr im Hinblick auf die erforderliche Dauertherapie massiv reduzieren und diese Therapieform mehr Patienten zugänglich machen. Weiterhin würde eine lange Lagerungsstabilität bedeuten, dass der Therapeut dem Patienten ein gewisses Kontingent an Serum-Augentropfen mit nach Hause geben kann und dieser dann bei wiederkehrenden Beschwerden mit der Therapie beginnen könnte ohne erneute Blutentnahme und Augentropfenherstellung in einer Klinik.

2a) Wird die Stabilität der Serum-AT bei Lagerung durch eine Verdünnung beeinflusst?

Da die meisten Patienten unter einem chronisch trockenem Auge leiden, kommt eine Verdünnung zu 20% Serum sehr häufig als Dauermedikation zum Einsatz um das Volumen der initialen Vollblutspende gering zu halten. Diese Verdünnung darf sich jedoch nicht auf die Lagerfähigkeit auswirken. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb drei Konzentrationen erstens unverdünnt (AT_{100}) zweitens mit einer Salzlösung (BSS) verdünnt auf 50% (AT_{50}) bzw. auf 20% (AT_{20}) Serum verwendet.

2b) Gibt es einen „Marker“ im Serum dessen Quantität einen Vorhersagewert für die Wundheilungseffektivität des Serums nach Lagerung hat und damit für Qualitätskontrollen besonders geeignet wäre?

Die Validierung der Funktionstüchtigkeit der AT nach Lagerung sollte einfach und kostengünstig zu bestimmen sein und eine verlässliche Aussagekraft über die Qualität bieten. Die Testmethode sollte entweder bereits zu den Standardverfahren der Laboratorien der zur Herstellung ermächtigten Einrichtungen zählen oder einfach zu etablieren sein. Die Kosten sollten in

einem sinnvollen Verhältnis zur Ersparnis aus der verlängerten Lagerung liegen. Verlässlich würde hier bedeuten, dass der Zerfall bzw. der konstante Gehalt des Markers mit Verlust bzw. Aufrechterhaltung der Effektivität der Serum-AT korreliert.

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Beschreibung der verwendeten Zelllinie

In den durchgeführten Experimenten wurden mittels Simianus Virus 40 (SV-40) immortalisierte Hornhautepithelzellen (HCE-Zellen) verwendet. Diese Zelllinie wurde von einer 49 Jahre alten Frau gewonnen. Durch die Transformation mit SV-40 ist die Lebensspanne der Zellen unendlich, sie produzieren den Virus jedoch nicht. Ihr Aussehen und ihre Eigenschaften lassen sich mit denen normaler Epithelzellen vergleichen. Sie stellen 64kD Keratin her.

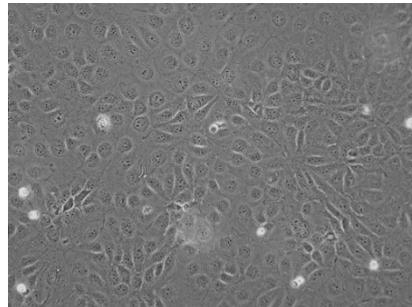


Abb. 2: HCE-Zellen
(Quelle:http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell_no=RCB1384&type=1)

2.1.2. Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen, d.h. bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einer Konzentration von 5% CO₂ im Brutschrank (HERAcell 150, Heraeus, Hanau), gehalten. Als Medium kam das von der Zellbank vorgeschrieben Zellkulturmedium ShemX zum Einsatz.

Zellkulturmedium ShemX

- 412 ml DMEM/Ham's F-12 (1:1; PAA, A-Pasching)
- 1 ml Insulin (Konzentration: 5 µg/ml; SIGMA, Taufkirchen)
- 50 µl Cholera-toxin (Konzentration: 0.1 µg/ml; SIGMA)
- 50 µl EGF (Konzentration: 10 ng/ml; SIGMA)
- 25 ml FBS „gold“ (Konzentration: 5%; PAA)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Konzentration: Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 µg/ml; PAA)

2.1.3. Subkultivierung und Züchtung

Zweimal pro Woche wurden die Zellen unter dem Mikroskop (Eclipse TS 100, NIKON) zur Beurteilung der Zellmorphologie untersucht und das Kulturmedium gewechselt. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen passagiert und auf neue Kulturträger (Cellstar Tissue Culture Dishes, Greiner bio-one, Frickenhausen) aufgeteilt.

Hierfür wurde unter der sterilen Werkbank (HERAsafe Werkbank, Heraeus) zunächst das verbrauchte Medium verworfen und die Zellen mit PBS (0,1 M; PAA) gewaschen um Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend zunächst für zehn Minuten in 2,5 mM EDTA/BSS-Lsg. (PAA), dann für fünf Minuten mit 1 ml einer 0,25%igen Trypsin-Lösung (PAA) im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden hierfür bei 37°C im Brutschrank für fünf Minuten inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des Ablösevorganges und Inaktivierung des Trypsins durch Zellkulturmedium wurde die Zellsuspension bei 3000 G für 15 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5804, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde abgenommen, durch neues Medium ersetzt und die Zellsuspension auf neue Petrischalen verteilt.

2.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Vor der Bestimmung der Zellzahl wurden analog der Subkultivierung die Zellen aus den Kulturschalen trypsiniert und eine Zellsuspension gewonnen. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl Trypanblaulösung (0,4%; Invitrogen, USA-Carlsbad) vermischt und die Zellzahl in eine Neubauer-Zählkammer (W.Schreck, Hofheim) bestimmt. Die in den beiden Zählrastern der Zählkammer befindlichen Zellen wurden ausgezählt und gemittelt. Nach folgender Formel wurde anschließend die Gesamtzellzahl errechnet.

$$\frac{(\text{Zellzahl} * \text{VM} * f)}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

VM: Volumen der zu zählenden Suspension (1000 µl)

f: Verdünnungsfaktor (10)

2.2. Probanden

Das Serum für die Untersuchung wurde von zehn gesunden Männer im Alter zwischen 23 und 57 (Mittelwert: $35 \pm 14,1$) Jahren gewonnen. Alle Probanden erfüllten die Kriterien für gesunde Blutspender entsprechend den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ in ihrer aktuellen Fassung aus der Gesamtnovelle 2005 unter Berücksichtigung der Änderungen und Ergänzungen von 2007 [Bundesanzeiger 2007]. Nach Aufklärung und Vorliegen eines schriftlichen Einverständnisses erfolgte eine ausführliche Anamnese anhand des Blutspenderfragebogens des Institutes für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikum Würzburg. Die grundsätzliche Eignung zur Blutentnahme wurde durch die Anamnese, die körperliche Untersuchung und die Kontrolle des Blutbildes überprüft. Jeder Proband wurde auf folgende Infektionsparameter untersucht: HBsAg, Anti-HIV und Anti-HCV untersucht. Das Studiendesign einschließlich der Aufklärungsbögen wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt.

Ø Alter	Ø Serummenge	Ø Hämatokrit
35	112 ml	44,13

Tabelle 3: Durchschnittsalter, -serummenge, -hämatokrit der Probanden (n=10)

2.3. Serumgewinnung und Lagerung

Die Blutentnahme und Präparation des Serums wurde gemäß dem Protokoll von Liu et al durchgeführt. Den Probanden wurden nach vorgeschriebener Hautdesinfektion unter aseptischen Bedingungen aus der Kubitalvene mit einer großlumigen Dialyseenadel (18 Gage) 30 sterile Serummonovetten (Sarstedt, Nümbrecht) à 9 ml entnommen. Die Entnahmeröhrchen wurden anschließend zur vollständigen Gerinnung des Blutes für zwei Stunden bei Raumtemperatur senkrecht gelagert. Hiernach wurde das Serum von den übrigen Bestandteilen des Blutes durch Zentrifugation (Z206A Zentrifuge, Hermle, Wehingen) für 15 min bei 3000 G getrennt [Liu et al. 2005]. Um eine möglichst geringe Restzellmenge zu erreichen wurde das Serum in 1 ml Schritten unter einer sterilen Werkbank (MSC-Advantage Werkbank, Thermo Fisher Sci., USA-

Waltham) abpipettiert, in sterile 260 ml Zellkulturflaschen (NUNC, Dk-Roskilde) überführt und anschließend mit BSS Salzlösung auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und in 10 ml aponorm Augentropffläschchen (Remy & Geiser, Anhausen) aus braunem Glas aliquotiert. Die Augentropffläschchen wurden anschließend entweder bei -20°C in einem Gefrierschrank oder bei +6°C im Kühlschrank über den geplanten Versuchszeitraum gelagert. Die Temperatur wurde wöchentlich kontrolliert. Die eingefrorenen Augentropfen wurden am Vorabend des Versuchstages in den Kühlschrank überführt um ein schonendes Auftauen zu gewährleisten.

2.4. Biochemische Charakterisierung der Serum-Proben

2.4.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Der ELISA gehört zur Gruppe der Immunassay-Verfahren. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Zytokine in einer Probe (Blutserum, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei werden die Eigenschaften spezifischer Antikörper genutzt, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Antikörper werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das sog. Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA verwendet, welcher im Gegensatz zum kompetitiven ELISA zwei Antikörper nutzt, welche beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden [Goldsby et al. 2003].

Protokoll zur Bestimmung von EGF (Human EGF, R&D, USA-Minneapolis)

Zu Beginn des Tests mussten die Proben, Standards und Reagenzien vorbereitet werden. 25 µl Serum-AT wurden mit 475 µl Calibrator Diluent gemischt, sodass sich eine 20 fache Verdünnung ergab. Des weiteren mussten eine EGF-Standardreihe von 250 bis 3,9 pg/ml hergestellt werden. Als Nullstandard diente der Calibrator Diluent.

Versuchsablauf:

1. 50 µl Assay Diluent in alle Wells pipettieren
2. 200 µl Standard, Kontrolle oder Probe hinzufügen (2 h inkubieren, 18-25°C)
3. Absaugen und 3x mit je 400 µl Wash Buffer spülen
4. 200 µl Conjugate hinzufügen (2 h inkubieren)
5. Absaugen und 3x spülen
6. 200 µl Substrate Solution hinzufügen (20 min inkubieren, lichtgeschützt)
7. 50 µl Stop Solution hinzufügen

Die Reaktion wurde gestoppt und die Auswertung mittels ELISA Reader (Fluorstar Optima ELISA Reader, BMG Labtech, Offenburg) musste innerhalb von 30 min geschehen. Die Auswertung erfolgte bei 450 nm Wellenlänge. Der Test wurde in Duplikaten durchgeführt.

Protokoll zur Bestimmung von Fibronectin (Human Fibronectin, Bender MedSystem, A-Wien)

Analog der o.g. Vorgehensweise wurden zu erste die Proben 1:10.000 verdünnt und alle Reagenzien vorbereitet. eine Standardreihe von 20 bis 0,31 ng/ml Fibronectin hergestellt. Vor Verwendung der 96-Well-Platten mussten diese noch zweimal mit Wash Buffer gespült werden und dürften nicht vollständig trocknen.

Versuchsablauf:

1. Herstellen der Standardverdünnungsreihe von 20 bis 0,31 ng/ml Fibronectin
2. 50 µl Assay Buffer mit 50 µl Probe mischen (Verdünnung 1:20.000)
3. 50 µl Biotin-Conjugate hinzugeben (2 h inkubieren, 18-25°C, 100 rpm auf einem Microplate Shaker)
4. Absaugen und 6x mit je 300 µl Wash Buffer spülen

5. 100 µl Streptavidin-HRP hinzugeben (1 h inkubieren)
6. Absaugen und 6x spülen
7. 100 µl TMB Substrate Solution hinzugeben (15 min inkubieren, lichtgeschützt)
8. 100 µl Stop Solution hinzugeben

Nun konnte der Test bei 420 nm Wellenlänge ausgelesen und anschließend ausgewertet werden. Der Test wurde in Duplikaten durchgeführt.

2.4.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren, mit welchem nicht nur Substanzen getrennt, sondern diese auch über Standards identifiziert und quantifiziert werden können. In diesem Fall sollten Vitamin A und E quantifiziert werden. Im Unterschied zur Gaschromatographie, die eine sehr gute Trennmethode für verdampfbare Stoffe ist, können mittels HPLC auch nicht flüchtige Substanzen analysiert werden [Milne et al. 1986].

Vor Durchführung der HPLC (HPLC-Analyse-Kit Vit. A & E, CHROMOSYSTEMS, München) mussten die Proben und die Standards wie folgt vorbereitet werden:

- 200 µl Serum (bzw. Standard) mit 20 µl Internal Standard/25 µl Precipitation Reagent I lichtgeschützt mischen und 30 s schütteln,
- 400 µl Precipitation Reagent II zugeben und erneut 30 s schütteln,
- 10 min bei -20 °C inkubieren,
- 10 min bei 9000 g zentrifugieren.

Zum Start des Tests wurden anschließend 50 µl des Überstandes in das HPLC-System injiziert. Nun wurden die Proben bei einer Flussrate von 1,5 ml/min und ca. 55 bar für 12 min eluiert. Vitamin A besitzt ein Absorptionsmaximum bei 325 nm und wurde nach ca. 2,5 min gemessen, während Vitamin E bei 295 nm und nach ca. 10 min gemessen wurde. Aus diesem Grund wurde nach 3,5 min Laufzeit der UV-Detektor umgeschaltet. Die Auswertung erfolgte automatisch mithilfe der PC-Software des Analyse-Kits.

2.4.3. Photometrie

Die Photometrie kann mit Hilfe von Licht die Konzentrationen von farbigen Lösungen bestimmen. Um z. B. die Konzentration eines Stoffes – hier Albumin und Gesamtprotein - in einer Lösung zu messen, wird zuerst derjenige Wellenlängenbereich des Lichtes ermittelt, der von den Molekülen oder Ionen in dieser Lösung absorbiert wird. Das ausgewählte Licht einer Wellenlänge wird z.B. mit Filtern oder mit Hilfe von Monochromatoren erzeugt. Bestrahlt man die Lösung eines absorbierenden Stoffes mit monochromatischem Licht, hängt die Absorption von der Konzentration des absorbierenden Stoffes und der Strecke ab, die das Licht durch die Lösung zurücklegen muss. Das transmittierte Licht wird gemessen und hieraus anhand der Extinktion die Konzentration des gesuchten Stoffes errechnet [Doumas et al. 1971, Doumas et al. 1981].

a) Die Messung des Albumins erfolgte durch einen Farbttest (COBAS INTEGRA Albumin Gen.2, Roche Diagnostics, Mannheim) mit Endpunkt-Methode. Die Proben (2 µl) wurden vor Testbeginn 1:10 mit H₂O verdünnt. Anschließend wurden die 22 µl Probenvolumen zuerst mit 100 µl einer 95 mmol/l Citrat-Lsg. und anschließend mit 30 µl einer 2:1 verdünnten 0,66 mmol/l Bromcresolgrün-Lsg. vermischt und die Reaktion gestartet. Albumin bindet bei einem pH-Wert von 4,1 den Anionenfarbstoff Bromcresolgrün und bildet einen blaugrünen Komplex. Die Extinktionszunahme des gebildeten Farbkomplexes wurde bei einer Wellenlänge von 583 nm gemessen und hieraus die Konzentration errechnet.

b) Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines Biuret-Reaktion-Kits (COBAS INTEGRA Gesamtprotein, Roche Diagnostics). Hierbei reagiert zweiwertiges Kupfer in alkalischer Lösung (pH 13,4) mit den Peptidbindungen der Proteine und bildet einen charakteristischen rosa- bis purpurfarbenen Biuret-Komplex. Die Proben wurden 3:22 mit H₂O verdünnt. Anschließend wurde zu den 25 µl Probenvolumen zuerst 95 µl der alkalische Natriumhydroxid-Lsg. (720 mmol/l) und anschließend 33 µl der Biuret-Reagenz-Lsg. (840 mmol/l Natriumhydroxid, 200 mmol/l Natriumkaliumtartrat, 150 mmol/l Kaliumiodid, 60 mmol/l Kupfersulfat) hinzugegeben und die Reaktion gestartet. Natriumkaliumtartrat verhindert die Ausfällung von Kupferhydroxid und Kaliumiodid die Autoreduktion von Kupfer. Die Extinktion und damit verbunden die Stoffmenge wurde bei 552 nm gemessen.

2.4.4. Turbidimetrie

Die Turbidimetrie ist ein optisches Analyseverfahren, womit sich die Konzentration feinverteilter, kolloidaler Teilchen in Flüssigkeiten quantitativ bestimmen lässt. Wird eine Suspension kleiner Partikel in einen Lichtstrahl verbracht, so wird ein Teil des eingetretenen Lichtes absorbiert und hieraus lässt sich die Konzentration bestimmen. Der Versuch ähnelt der Photometrie [Becker et al. 1968].

Die Konzentration an humanem Immunglobulin A (IgA) wurde mittels immunologischem Trübungstest erhoben (COBAS INTEGRA Immunglobulin A, Roche Diagnostics). IgA bildet mit einem spezifischem Antiserum einen Niederschlag, der turbidimetrisch bei 340 nm gemessen wurde. Hierzu wurden 25 µl der 5:20 mit H₂O verdünnten Proben zuerst mit 100 µl einer Anti-IgA-T-Antiserum-Lsg. und danach mit 10 µl einer Lsg. zur Antigenüberschussprüfung vermischt. Die gemessene Extinktion wurde mit Standardverdünnungsreihen verglichen und der IgA-Probengehalt bestimmt.

2.4.5. Restzellzahlbestimmung

Verbleibende Zellen (Thrombozyten und Leukozyten) im Serum können Zytokine bzw. Enzyme freisetzen [Boehlen und Clemetson 2001]. Um die zelluläre Verunreinigung zu Quantifizieren erfolgte die Bestimmung der Absolutzellzahlen von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten mittels Durchflusszytometer (Plasma Count Kit, BD Bioscience, USA-San Jose). Das durchflusszytometrische Verfahren erlaubt eine schnelle, quantitative und reproduzierbare Methode der Identifikation und Auszählung von in Suspension befindlichen Zellen.

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Absolutzellzahl von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten ein Single-tube-Assay verwendet.

Versuchsablauf:

1. Vorbereiten von 200 µl Probevolumen in einem Falcon-Röhrchen
2. Vorbereiten des BD Trucount-Röhrchens (enthält das Bead Pellet)
3. 50 µl Probe in das Trucount-Röhrchen überführen
4. 100 µl Reagenz A (Thiazol-Orange) hinzugeben

5. 20 µl Reagenz B (Fluorchrommarkierte Antikörper) hinzugeben
6. Röhrchen schließen und mischen
7. 15 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubieren
8. 1 ml CellWASH-Lsg. hinzugeben und Färbeprozess unterbrechen
9. Röhrchen schließen und mischen

Nun konnten die Zellen im Durchflusszytometer analysiert werden. Durch den Zerfall des Bead Pellets wurde eine bekannte Anzahl von fluoreszierenden Beads freigesetzt, die als Vergleich für den Test herangezogen wurden. Während der Analyse erhielt man die Absolutzellzahl (Zellen/µl) der Restzellen in der Probe durch Division der Anzahl der Restzellereignisse durch die Anzahl der Fluoreszenz-Beadereignisse und anschließende Multiplikation des Ergebnisses mit einer Assay-spezifischen Vorgabe [Vowells et al. 1998].

2.5. Funktionelle Tests

2.5.1. ATP-Assay

Als Maß für die Vitalität wurde die Zunahme des intrazellulären ATP-Gehalts der Zellkulturen mit einem Luziferin-Luziferase basierten Lumineszenz-Assay (ATPlite, PerkinElmer, USA-Waltham) bestimmt [Geerling et al. 2001]. Hierzu werden in 96-Lochplatten 3000 Zellen pro Loch nach 72-stündiger Inkubation mit serumhaltigem Kulturmedium bis zu 30% Konfluenz und für weitere 24 Stunden mit serumfreiem, definiertem Kulturmedium (sog. Minimalmedium; die Zellen sollen sich hier nicht mehr vermehren und die Wirkung des Kulturmediums ausgeschlichen werden) unter Zusatz von 1% Albumin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Nach Waschen mit PBS wurde in jedes Loch einer 96-Lochplatte 200 µl eines Testpräparates oder einer Kontrolle gegeben. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt. Als negative Kontrolle (maximale Wachstumshemmung) diente eine 1%ige Benzalkoniumchlorid-Lösung (BAC; (SIGMA)), als positive Kontrolle (maximale Wachstumsförderung) serumhaltiges Kulturmedium. In diesem Dosis-Wirkungsexperiment - je höher die Serumkonzentration, desto höher sollte die intrazelluläre ATP-Zunahme sein - werden die Zellen für 24 und 48 h mit den Verdünnungsreihen der Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wird die Testlösung entfernt, die Kulturen einmal mit PBS gewaschen, 100 µl PBS

zugegeben und das intrazelluläre ATP durch Zugabe von 50 µl Zellextraktionsreagenz und 20-minütiger Inkubation auf einem Rüttler extrahiert. Nach 1:0,6 Mischung von Zelllysat und Luzeiferin-Luziferase Reagenz in weißen 96-Lochplatten (Cellstar 96 Well, Greiner bio-one) wird der ATP-Gehalt mit dem Luminometer (Fluorstar Optima, BMG Labtech) bestimmt. Aus dem Mittelwert der Triplikate jeder Testsituation (Test) wird unter Bezug auf den mittleren ATP-Gehalt der negativen (MI) und positiven Kontrolle (M0) des prozentuale Zellwachstums (% ZW) errechnet:

$$\% \text{ ZW} = \frac{\text{Test-MI}}{\text{MO-MI}} \times 100$$

Der prozentuale Variationskoeffizient des ATP-Gehaltes wird als Standardabweichung des Mittelwertes berechnet.

2.5.2. Kolonie-Dispersions-Assay

Anhand eines Kolonie-Dispersions-Assays lässt sich die Migration von Epithelzellen messen. Hierzu wurden 6-Loch-Kulturplatten mit Kollagen-I (SIGMA) als 0,01%-ige 0,1 M Essigsäurelösung (Carl Roth, Karlsruhe) in 750 µl pro Loch (61,7 µg/9,6 cm²) beschichtet und je 12.000 Zellen mit 150 µl Kulturmedium in Silikonzylindern (flexiPERM MICRO 12 Silikonzylinder, Greiner bio-one) bis zur Konfluenz inkubiert. Bei Konfluenz wurde die Proliferation der Zellen durch 24-stündige Inkubation mit 200 µM Hydroxyurea-Lsg. (SIGMA) inhibiert [Geerling et al. 2001]. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen für weitere 24 h mit definiertem Kulturmedium ohne Wachstumsfaktorzusatz inkubiert. Danach wurden die Silikonzylinder entfernt, jedes Kulturloch dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit entsprechend verdünnten Testlösungen für 24, 48, 96 und 144 h inkubiert, bevor sie mit 90% Methanol (Carl Roth) für 10 Minuten fixiert und mit Hämalaunlösung nach Mayer (Carl Roth) für 30 min. gefärbt wurden. Die Fläche des konfluenten Zellrasens wurde mit einer definierten Vergrößerung digital fotografiert und mit

Hilfe des Programms Uthesca Image Tool vermessen. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.5.3. Scratch-Wound-Assay (Gesamtwundheilung)

Mit Hilfe des Scratch-Wound-Assay sollte die Wundheilungspotenz von Serum-AT auf die Epithelzellen bestimmt werden. Hierzu wurden 24-Loch Kulturplatten (Multiwell 24 well, Becton Dickinson) mittels 0,01%iger-Kollagen-I-Lösung mit 10 µg/cm² beschichtet. Jedes Well wurde mit 250.000 Zellen in 500 µl Kulturmedium besät und über 72 h zu einer Monolayer inkubiert. Nachdem der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen wurde, wurde er für weitere 24 h mit serumfreiem Minimalmedium inkubiert. Um eine Wunde zu simulieren wurde die Zellschicht mit einer 100 µl Pipetten-Spitze pro Well zweimal „zerkratzt“ [Garrett et al. 2007]. Die so abgelösten Zellen wurden durch dreimaliges Spülen entfernt, bevor die Wells mit den Testlösungen für 12 bzw. 24 h inkubiert wurden. Nach 12 bzw. 24 h wurden die Wells analog zum Migrationsassay gefärbt und die Restwunde mittels Messokular (NIKON) bestimmt und mit dem Wert für 0 h verglichen. Als Negativkontrolle kamen die unkonservierten Tränenersatzmittel Hylo-Vision Gel sine® (0,30% Natriumhyaluronat, OmniVision) und Artelac EDO® (3,20 mg Hypromellose, Bausch&Lomb) zum Einsatz.

2.6. Sterilkontrolle

Zur Kontrolle der Qualität der Serum-Augentropfenherstellung wurden aus den Augentropffläschchen Sterilkontrollen durchgeführt. Hierzu wurde mit Hilfe von BacT/ALERT® PF (bioMérieux GmbH, Nürtingen) Kulturfläschchen eine qualitative Bestimmung von aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen in den Proben durchgeführt. Die Proben wurden frisch und nach einer Woche Lagerung bei 6°C überprüft. Hierzu ist nur ein kleines Probenvolumen von mindestens 0,5 ml bzw. optimal 2-3 ml Blut notwendig. Nach der Beimpfung wurden die Kulturfläschchen im Brutschrank inkubiert und auf das Wachstum von Mikroorganismen überwacht.

Das System misst über einen kolorimetrischen Sensor anhand des jeweils reflektierten Lichts den Gehalt des ursprünglich im Kulturmedium gelösten

Kohlendioxids (CO₂), das - sofern die Testprobe Mikroorganismen enthält – als bakterielles Stoffwechselprodukt bei der Umsetzung der im Nährmedium befindlichen Substrate freigesetzt wird. Bei Wachstum der Mikroorganismen wechselt mit zunehmendem CO₂-Gehalt die Farbe des im Boden der Kulturfläschchen integrierten gasdurchlässigen Sensors von blaugrün nach gelb.

2.7. Statistische Tests

Die Daten wurden in Microsoft Excel erfasst und codiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket SPSS 15.0 für Windows (SPSS GmbH, München). Im Rahmen deskriptiver Analysen wurden über den longitudinalen Studienverlauf Mittelwerte für die Messwerte berechnet und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Für alle Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt.

Die einfaktorielle Anova ist ein Verfahren für den Vergleich von mindestens zwei Stichproben. In dieser Arbeit wurden pro Test pro Konzentration, z.B. Konzentration von Vitamin A für AT₁₀₀, die Werte für null bzw. sieben Tage, drei und sechs Monate miteinander verglichen. Die ANOVA überprüft die Hypothese, dass jede Stichprobe aus der gleichen zugrunde liegenden Wahrscheinlichkeitsverteilung stammt, gegenüber der alternativen Hypothese, dass die zugrunde liegenden Wahrscheinlichkeitsverteilungen nicht für alle Stichproben gleich sind. Lag der p-Wert unterhalb der Signifikanzgrenze von 0,05, kam ein zweiter statistischer Test zur Überprüfung der Werte für frische und für sechs Monate gelagerte AT zum Einsatz. Da es sich nur um zwei Stichproben handelte, konnte hierfür der t-TEST verwendet werden.

2.8. Verwendete Lösungen und Ansätze

Zellkulturmedium ShemX

412 ml DMEM/Ham's F-12 (1:1)

1 ml Insulin (Konzentration: 5 µg/ml)

50 µl Choleratoxin (Konzentration: 0.1 µg/ml)

50 µl EGF (Konzentration: 10 ng/ml)

25 ml FBS „gold“ (Konzentration: 5%)

5 ml Penicillin/Streptomycin (Konzentration: Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 µg/ml)

Hydroxyurea-Lösung

200 µM Lsg. in ShemX

Serumfreies Minimalmedium

DMEM/Ham's F12 (1:1) + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% bovines Serumalbumin

Apotheke d. Klinikums d. Universität Würzburg (Josef-Schneider-Straße 2, 97080 Würzburg)

Balanced Saltsolution (BSS) für die Ophthalmologie

Ethanol

BD Biosciences (2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131 USA)

Plasma Count Kit (Nr. 338331)

Bender MedSystems GmbH (Campus Vienna Biocenter 2, A-1030 Wien)

Human Fibronectin-ELISA (BMS2028)

bioMérieux Deutschland GmbH (Weberstraße 8, 72622 Nürtingen)

BacT/ALERT PF

Carl Roth GmbH + Co. KG (Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe)

Hämalaunlösung nach Mayer (Nr.: T865.2)

Methanol (Nr.: CP43.1)

Essigsäure (Nr.: 3738.1)

CHROMOSYSTEMS GmbH (Heimburgstr. 3, 81243 München)

HPLC-Analyse-Kit (Nr.: 34000)

Delta Select GmbH (Otto-Hahn-Str. 31-33, 63303 Dreieich)
Aqua Delta Select Spüllösung

Fluca (Vertrieb über SIGMA-Aldrich Chemie GmbH)
Albumin (Rinderserum, BioChemika FractionV/Nr.: 05488)

Invitrogen Corporation (1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA-92008 USA)
Trypan Blau 0,4% (Nr.: 15250-061)

PAA Laboratories GmbH (Haidmannweg 9, A-4061 Pasching)
DMEM/Ham's F-12 (ohne L-Glutamin, mit Phenolrot/Nr.: E15-012)
Dulbecco's PBS (mit Ca & Mg, ohne Phenolrot/Nr.: H15-001)
FBS „gold“ (Nr.: A11-151)
Hank's BSS (ohne Ca & Mg, mit Phenolrot/Nr.: H15-010):
HEPES Buffer Solution (1 M/Nr.: S11-001)
Penicillin/Streptomycin (100x/Nr.: P11-010)
Trypsin-EDTA(1x/Nr.: L11-004)

Roche Diagnostics GmbH (Sandhofer Str. 16, 68298 Mannheim)
COBAS INTEGRA Albumin Gen.2 (Nr. 03183688)
COBAS INTEGRA Immunglobulin A (Nr. 20737755)
COBAS INTEGRA Gesamtprotein (Nr. 20737615)

R&D Systems, Inc (614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413 USA)
Human EGF (Nr.: DEG00)

SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (Eschenstr. 5, D-82024 Taufkirchen)
Benzalkoniumchlorid (Nr.: B6295)
Choleratoxin (ca. 95%/Nr.: C8052)
EGF (Nr.: E4127)
Hydroxyurea (min. 98% TLC/Nr.: C7761-1G)
Insulin (≥ 27 USP units per mg/Nr.: I6634)
Kollagen (Typ I, Ratte/Nr.: H8627-10MG)

PerkinElmer (40 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451 USA)
ATPlite (Nr.: 6016947)

2.9. Verwendete Geräte und Materialien

Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ 07417 USA)
Falcon 15 ml Proberöhrchen (Nr. 352095)
Multiwell 24 well (Nr. 353047)

BMG Labtech GmbH (Hanns-Martin-Schleyer-Str. 10, 77656 Offenburg)
Fluorstar Optima Reader

CASIO Europe GmbH (Casio-Platz 1, 22848 Norderstedt)
Exilim EX-Z75 Digitalkamera

Corning Inc. (One Riverfront Plaza, NY 14831 USA)
Costar Stripetten 10 ml (steril; Nr. 4488)

Eppendorf AG (Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg)
Centrifuge 5804
epT.I.P.S (2-200 µl: 0030 000.870)
(50-1000 µl: 0030 000.919)
Research Pipetten (100, 300, 1000)

greiner bio-one GmbH (Maybachstr.2, 72636 Frickenhausen)
Cellstar TC-Plate 6 Well (No. 657 160)
Cellstar 96 Well Cell Culture Plate (No. 655 180)
Cellstar Tissue Culture Dishes (No. 639 160)
flexiPERM MICRO 12 (No. 90011436)

Heraeus Holding GmbH (Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau)
HERAcell 160 (CO₂-Inkubator)
HERAsafe (Werkbank)

Hermle Labortechnik GmbH (Siemensstrasse 25, 78564 Wehingen)
Z206A (Zentrifuge)

INTEGRA Biosciens GmbH (Ruhberg 4, 35463 Fernwald)
PIPETBOY acu

Köttermann Labortechnik GmbH & Co. (Industriestr. 2-10, 31311 Uetze)
Wasserbad, Typ 3047

Nikon Instruments Europe B.V. (Laan van Kronenburg 2, NL-1183AS
Amstelveen)
Eclipse TS 100 (Mikroskop)

NUNC A/S (Kamstrupvej 90, DK-4000 Roskilde)
260 ml Zellkulturflaschen (steril, Nr. 147589)

Remy & Geiser GmbH (Remy-Geiser-Strasse 1, 56584 Anhausen)
aponorm (Augentropffläschchen 10ml, steril)

Sarstedt AG & Co. (51588 Nümbrecht)
S-Monovette (Nr. 02.1726.021)
Filtropur S 0.2 (Nr.: 83.1826.001/sterile Filter)

Schott AG (Hattenbergstraße 10, 55122 Mainz)
Duran Laborglasflaschen (100 ml: 00421784)
(500 ml: 00985524)

Thermo Fisher Scientific (81 Wyman Street, Waltham, MA 02454 USA)
MSC-Advantage (Werkbank)

W. Schreck (Hofheim)
Neubauer Zählkammer (0,0025 mm²; Tiefe: 0,1 mm)

3. Ergebnisse

3.1. Biochemische Charakterisierung der Serum-Proben

3.1.1. Albumin

Albumin ist ein globuläres Protein aus 584 Aminosäuren ohne Kohlenhydratanteil und stellt mit 55-65% den größten Anteil der Plasmaproteine. Es dient der Erhaltung des onkotischen Plasmadrucks, dem Transport und der Speicherung einer Vielzahl von Liganden und Stoffen wie z.B. Calcium, Pharmaka und auch Schwermetallen. Es hat außerdem einen positiven Effekt auf die Apoptose von Epithelzellen und auf die Wundheilung.

Die Konzentration an Serumalbumin wurde zu den Messpunkten frisch, nach einer Woche und nach drei bzw. sechs Monaten in allen Proben photometrisch in der klinischen Chemie der Universitätsklinik Würzburg erhoben. Diesem Photometrieverfahren liegt ein Farbttest mit Endpunkt-Methode zu Grunde. Wie folgender Tabelle und Grafik zu entnehmen, unterlag die Menge nur sehr geringen Schwankungen. Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den frischen, sieben Tagen und den sechs Monate gelagerten Proben (AT_{100} : $p = 0,11$ / AT_{50} : $p = 0,44$ / AT_{20} : $p = 0,84$).

Albumin g/dl	0 Tage	7 Tage	3 Monate	6 Monate
AT_{100}	4,71 ± 0,226	4,54 ± 0,222	5,1 ± 0,397	4,81 ± 0,301
AT_{50}	2,44 ± 0,143	2,42 ± 0,133	2,68 ± 0,316	2,5 ± 0,134
AT_{20}	0,93 ± 0,142	0,92 ± 0,06	0,97 ± 0,078	0,95 ± 0,112

Tabelle 4: Albuminkonzentration (MW) in g/dl ± Standardabweichung (n = 10)

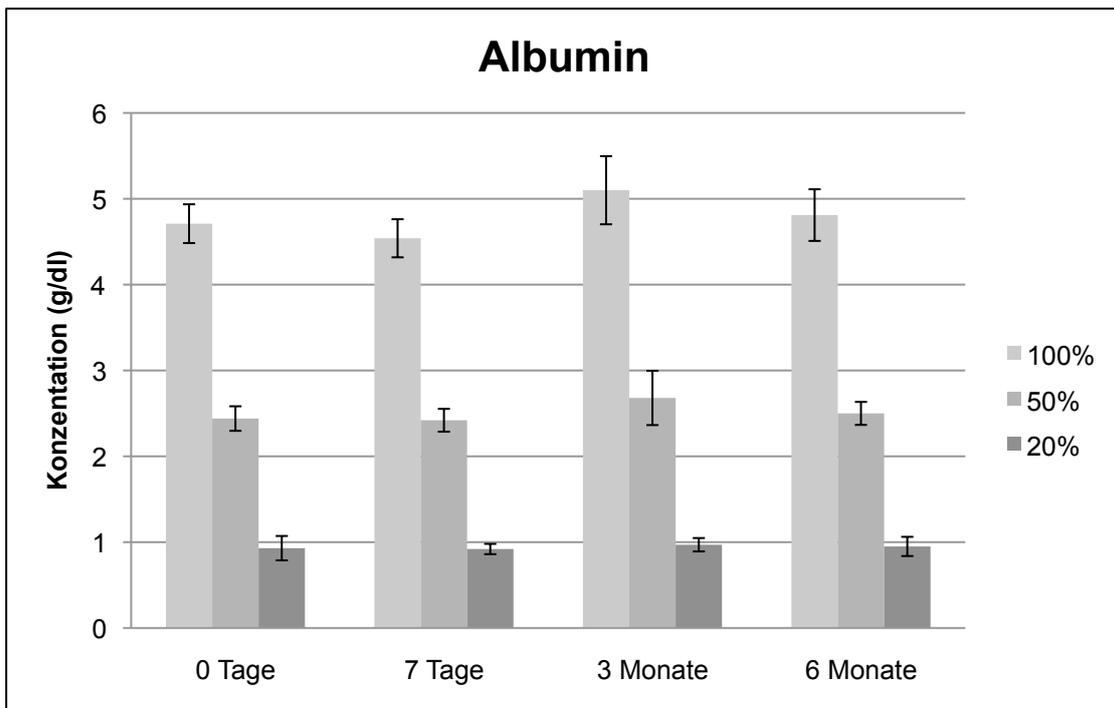


Abb. 3: Albuminkonzentration (MW \pm STABW in g/dl)

3.1.2. Gesamtprotein

Plasmaproteine wie z.B. Albumin oder die Gruppe der Globuline werden vorwiegend in der Leber, den Plasmazellen, Lymphknoten, der Milz und im Rückenmark synthetisiert. Bei einer Erkrankung kann sowohl der Gesamtproteinspiegel als auch das Verhältnis der einzelnen Fraktionen erheblich von den Normwerten abweichen.

Das Gesamtprotein wurde in gleicher Weise wie die Konzentration von Albumin bestimmt. Auch hier kam ein photometrisches Messsystem zum Einsatz, in diesem Fall auf einer Biuret-Reaktion basierend, hierbei bildet sich ein Kupfer-Protein-Komplex. Für alle Mittelwerte ($n = 10$) der Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen frischem, sieben Tage und sechs Monate gelagertem Serum (AT_{100} : $p = 0,67$ / AT_{50} : $p = 0,06$ / AT_{20} : $p = 0,21$).

Gesamtprotein g/dl	0 Tage	7 Tage	3 Monate	6 Monate
AT ₁₀₀	7,39 ± 0,359	7,29 ± 0,446	8,03 ± 0,779	7,5 ± 0,6
AT ₅₀	3,63 ± 0,21	3,72 ± 0,183	4,06 ± 0,383	3,87 ± 0,219
AT ₂₀	1,39 ± 0,207	1,42 ± 0,133	1,58 ± 0,108	1,53 ± 0,168

Tabelle 5: Gesamtproteingehalt (MW) in g/dl ± STABW (n=10)

3.1.3. Vitamin A

Vitamin A (Retinol) spielt v.a. bei der Anpassung der Augen an Dunkelheit eine wichtige Rolle. Es dient darüber hinaus als eine Art „Epithelschutzvitamin“ und ist an der Ausbildung und Stabilisierung von biologischen Membranen beteiligt. Es kommt auch im Knochenstoffwechsel sowie bei der Bildung von Steroidhormonen vor. Weiterhin fördert es die Proteinsynthese und Mitoserate besonders von schleimbildenden Zellen. Ein Mangel an Vitamin A kann zu Bitot-Flecken auf der Hornhaut, Nachtblindheit und Hautaustrocknung führen. Die Bestimmung von Vitamin A erfolgte ebenfalls über den gesamten Studienzeitraum durch ein isokratisches HPLC-Verfahren. Auffällig erschien, dass die Konzentration z.B. an Gesamtprotein innerhalb der Probanden nur sehr geringe Unterschiede aufwies, während die Werte für Retinol eine größere Streuung zeigten. Wie der Folgenden Tabelle zu entnehmen, blieben die Konzentrationen trotz verlängerten Lagerung über den gesamten Studienzeitraum konstant und zeigten statistisch keinen Unterschied (AT₁₀₀: p = 0,42 / AT₅₀: p = 0,75 / AT₂₀: p = 0,45).

Vitamin A µmol/l	0 Tage	7 Tage	3 Monate	6 Monate
AT ₁₀₀	2,813 ± 0,6112	2,921 ± 0,71	3,944 ± 0,8554	3,06 ± 0,7787
AT ₅₀	1,459 ± 0,335	1,53 ± 0,369	1,641 ± 0,360	1,54 ± 0,294
AT ₂₀	0,631 ± 0,141	0,636 ± 0,174	0,691 ± 0,147	0,76 ± 0,273

Tabelle 6: Vitamin-A-Konzentration (MW) in µmol/l ± STABW (n=10)

3.1.4. Vitamin E

Vitamin E oder α -Tocopherol wirkt als Teil eines Redoxsystem und schützt so als Antioxidans u.a. Vitamin A sowie die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen vor freien Radikalen und Peroxidasen.

Die Vitamin E-Konzentration wurde gleichzeitig mit Vitamin A mittels eines HPLC-Reagenzienkits erhoben. Auch hier zeigte sich zwischen den Probanden verschiedene Konzentrationen, während intraindividuell nur geringe Schwankungen vorlagen. Es zeigte sich keine signifikante Differenz (AT_{100} : $p = 0,33$ / AT_{50} : $p = 0,015$ / AT_{20} : $p = 0,08$) für eine der Konzentrationen.

Vitamin E $\mu\text{mol/l}$	0 Tage	7 Tage	3 Monate	6 Monate
AT_{100}	27,96 \pm 4,506	26,24 \pm 2,914	29,49 \pm 4,685	29,59 \pm 4,828
AT_{50}	14,13 \pm 2,094	13,59 \pm 2,525	16,27 \pm 2,916	15,61 \pm 3,019
AT_{20}	6,4 \pm 2,135	5,3 \pm 1,275	6,44 \pm 1,183	7,28 \pm 1,550

Tabelle 7: Vitamin-E-Konzentration (MW) in $\mu\text{mol/l} \pm \text{STABW}$ (n=10)

3.1.5. Immunglobulin A

Immunglobulin A zählt zur humoralen Immunabwehr und gehört zu den Antikörpern. Es wird in Plasmazellen synthetisiert und ist das Hauptimmunglobulin der Sekretion. Man findet es in Schleim, Speichel, Darmsekret und Tränenflüssigkeit. Immunglobuline schützen den Körper vor eindringenden Organismen oder Erregern. Sie besitzen eine Antigenbindungsstelle und können damit Toxine direkt neutralisieren, immunkompetente Zellen aktivieren, die Virusinfektiosität herabsetzen und eine Entzündung hervorrufen. IgA kann in Kombination mit Lysozym bakterizid auf gramnegative Bakterien und alleine auch antiviral wirken jedoch kein Komplement aktivieren.

Die IgA Menge der Proben wurde durch einen immunologischen Trübungstest ausgewertet. IgA bildet mit einem spezifischem Antiserum einen Niederschlag, der turbidimetrisch gemessen wird. Interindividuell gab es einen großen

Schwankungsbereich von bis zu 140 mg/dl. Intraindividuell aber war die Konzentration konstant. Für alle drei AT-Konzentrationen zeigte sich statistisch ein p-Wert von 0,99.

IgA mg/dl	0 Tage	7 Tage	3 Monate	6 Monate
AT ₁₀₀	248,3 ± 49,66	247 ± 48,19	252,9 ± 51,06	252 ± 47,79
AT ₅₀	130,7 ± 25,90	132,8 ± 23,96	133,6 ± 36,43	133,8 ± 26,49
AT ₂₀	55,9 ± 12,86	56,6 ± 12,71	55,2 ± 14,50	57,4 ± 12,08

Tabelle 8: Konzentration an IgA (MW) in mg/dl ± STABW (n=10)

3.1.6. EGF

Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Protein, das bei der Einleitung der Mitose als Signalmolekül auftritt. Es stimuliert die Proliferation und Migration einer Reihe von Zelltypen u.a. von Hornhautepithelzellen, weshalb es auch in oben beschriebener Zellkultur als Wachstumsfaktorzusatz verwendet wird. Weiterhin spielt es mit anderen Zytokinen eine Rolle bei der Wundheilung. Das EGF-Protein funktioniert im Zusammenspiel mit einer Reihe von Rezeptoren, die unter der Bezeichnung Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren (EGFRs) zusammengefasst sind.

Die EGF-Konzentration wurde mit einem Sandwich-ELISA bestimmt. Die Konzentration für 100% Serum-AT betrug im Mittel bei frischem Serum 464,5 pg/ml, nach sieben Tagen Lagerung bei +4°C 472,5 pg/ml und nach drei bzw. sechs Monaten bei -20°C 497,4 bzw. 472,4 pg/ml (p=0,97). Auch die Verdünnungen zu 50% und 20% Serum zeigten keinen signifikanten Unterschied (50%: p=0,82/ 20%: p=0,82).

EGF pg/ml	0 Tage	7 Tage	3 Monate	6 Monate
AT ₁₀₀	464,5 ± 110,0	472,2 ± 215,8	497,4 ± 96,0	472,4 ± 133,0
AT ₅₀	189,2 ± 58,8	217,6 ± 82,2	244,8 ± 107,4	210,8 ± 111,8
AT ₂₀	76,2 ± 25,4	89,4 ± 29,8	92,0 ± 41,8	96,0 ± 40,8

Tabelle 9: EGF-Konzentration (MW) in pg/ml ± STABW (n=5)

3.1.7. Fibronektin

Fibronektin ist ein extrazelluläres Glykoprotein, welches in vielen physiologischen Abläufen, unter anderem in der Gewebereparatur sowie für die Migration und Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle spielt.

Analog zum EGF wurde ein ELISA zur quantitativen Bestimmung durchgeführt. Die Schwankungen zwischen den Messpunkten waren nicht signifikant (AT₁₀₀: p = 0,92 / AT₅₀: p = 0,91 / AT₂₀: p = 0,46).

Fibronektin µg/ml	0 Tage	7 Tage	3 Monate	6 Monate
AT ₁₀₀	140,7 ± 17,1	133,5 ± 29,8	132,2 ± 23,2	132,5 ± 22,1
AT ₅₀	86,4 ± 13,4	84,5 ± 31,2	79,7 ± 13,6	77,7 ± 13,0
AT ₂₀	25,3 ± 4,4	27,9 ± 6,3	21,5 ± 6,0	29,4 ± 13,0

Tabelle 10: Fibronektin-Konzentration (MW) in µg/ml ± STABW (n=5)

3.1.8. Restzellzahl

Da es noch keine Spezifikation für Serumaugentropfen gibt, soll im Folgenden die Richtlinie und die darin enthaltenen Vorgaben zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten der Bundesärztekammer und des Paul-Ehrlich-Institutes für gefrorenes Frisch-Plasma (GFP) gelten. Die Restzellzahl der Seren wurde am Entnahmetag in

den Laboren der Transfusionsmedizin bestimmt. Keine der gewonnenen Proben zeigte eine über den Grenzwerten der o.g. Richtlinie liegende Restzellzahl.

	Probe (Ø pro µl)	Vorgabe (pro µl)
Erythrozyten	296,81 ± 127,90	6.000
Leukozyten	2,92 ± 2,63	100
Thrombozyten	4.962,43 ± 2790,27	50.000

Tabelle 11: Restzellzahl und Vorgaben für GFP zur Hämotherapie (n=10)

3.2. Funktionelle Tests

3.2.1. ATP-Assay

Als Maß für die Proliferation wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt der Zellkulturen in Relation zu den plattenspezifischen Negativ- und Positivkontrollen bestimmt und in Prozent wiedergegeben. Die Messungen wurden nach 24 bzw. 48 h durchgeführt.

Sowohl AT₁₀₀ als auch AT₅₀ zeigten einen Anstieg des ATP-Gehalts von 24 auf 48 h und dadurch lässt sich auf eine Zunahme der Zellzahl schließen, während AT₂₀ eine Abnahme aufwies. Die Zunahme war bei unverdünntem Serum deutlich stärker ausgeprägt und betrug im Mittel +20,87% im Vergleich zu +12,94% bzw. -4,77%. Statistisch zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 48 h-Werten (AT₁₀₀: p = 0,69 / AT₅₀: p = 0,88 / AT₂₀: p = 0,77). Auffällig war zudem, dass die Werte für unverdünntes Serum nach 48 h teilweise deutlich höher lagen als die der Positivkontrolle und damit die Proliferation der Zellen stärker unterstützte als das Standardkulturmedium (siehe Abb. 4).

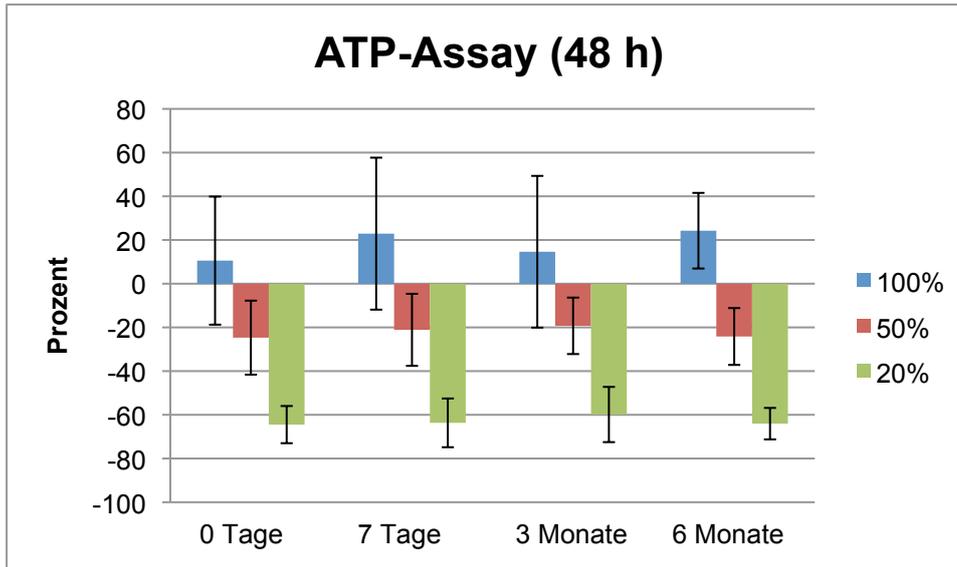


Abb. 4: ATP-Assay (MW in % ATP-Gehalt nach 48 h \pm STABW) im Vergleich zum Standardkulturmedium ShemX (Null-Wert)

3.2.2. Kolonie-Dispersions-Assay

Mit Hilfe des Kolonie-Dispersions-Assay sollte die Migrationsfähigkeit der HCE-Zellen unter den verschiedenen Serum-Konzentrationen über max. 144 h erfasst werden. Hierzu wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen durch Inkubation mit Hydroxyurea unterbunden. Aufgrund der begrenzten Probenmenge war es nicht möglich die AT mehrfach zu wechseln. Dieser Test stellte also eine besondere Herausforderung für die Inhaltsstoffe und die Pufferkapazität der Seren dar.

Zu jedem Messpunkt und bei jeder Konzentration war eine Zunahme des Durchmessers der Zellrasen zu beobachten, d.h. bei allen drei Proben kam es zu einer Zellmigration. Nur bei der 144 h/6 Monate – Probe für AT₂₀ konnten keine Zellen mehr angefärbt werden. Des weiteren zeigte sich eine stärkere Dispersionstendenz mit zunehmendem Serumgehalt, d.h. AT₁₀₀ unterstützte die Migration am stärksten. Statistisch zeigte sich beim Vergleich der Werte für 48 h kein signifikanter Unterschiede für AT₂₀ ($p = 0,065$) im Gegensatz zu AT₅₀ ($p = 0,031$) und unverdünntem Serum ($p = 0,001$). Hierbei lag jedoch der AT₅₀-Mittelwert für sechs Monate höher als für frisches bzw. sieben Tage altes Serum. Alle Konzentrationen zeigten für sechs Monate einen signifikant geringeren Wert nach 144 h als die frischen Proben nach gleicher Zeit.

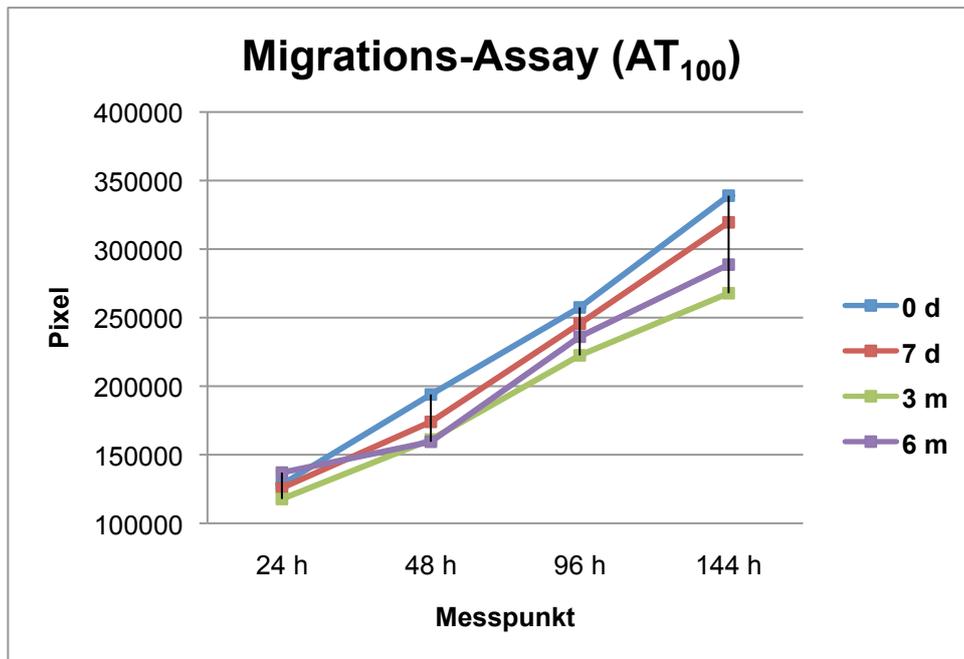


Abb. 5a: Vergleich der Werte für die Messpunkte von 100% Serum; alle Kurven zeigen eine ähnliche Steigung und damit Migrationstendenz für die Messungen nach 0 d, 7 d, 3 Mon & 6 Mon (n=10)

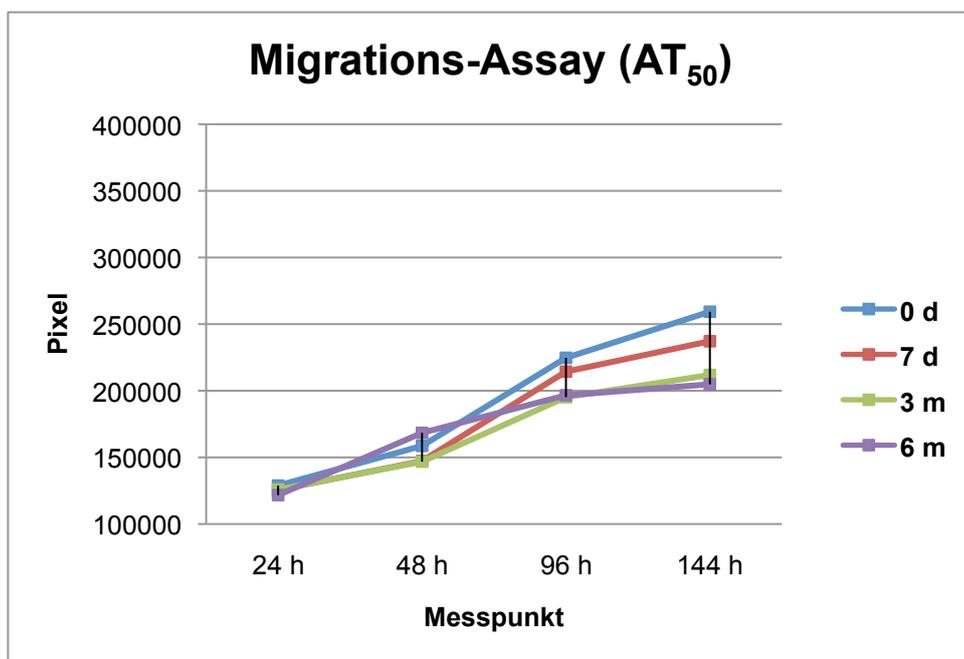


Abb. 5b: Vergleich der Werte für die Messpunkte von 50% Serum; alle Kurven zeigen eine ähnliche Steigung und damit Migrationstendenz für die Messungen nach 0 d, 7 d, 3 Mon & 6 Mon (n=10)

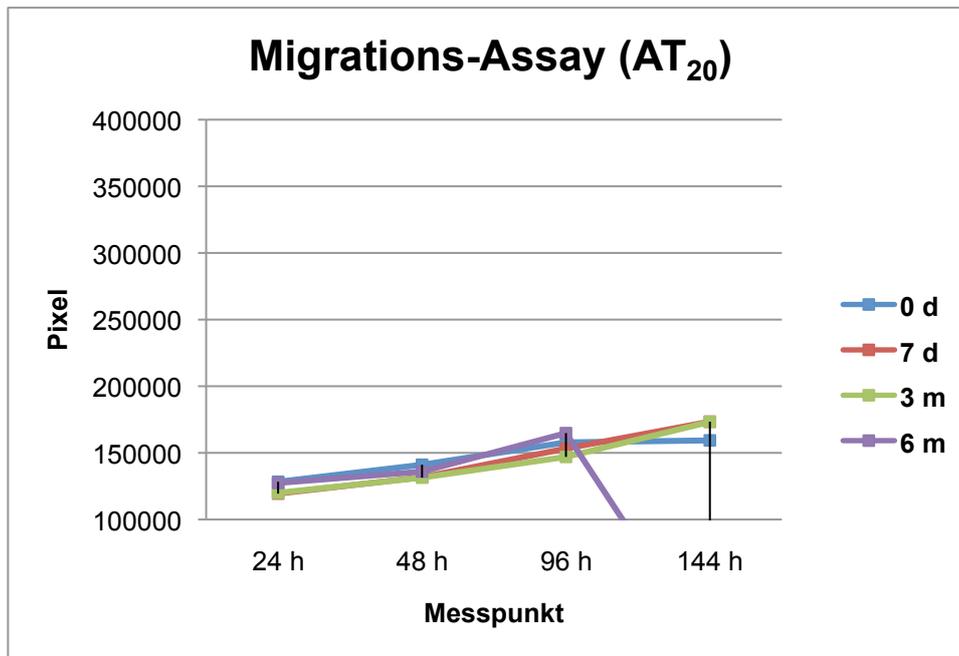


Abb. 5c: Vergleich der Werte für die Messpunkte von 20% Serum; alle Kurven zeigen eine ähnliche Steigung und damit Migrationstendenz für die Messungen nach 0 d, 7 d, 3 Mon & 6 Mon bis zu den Werten für 144 h (n=10)

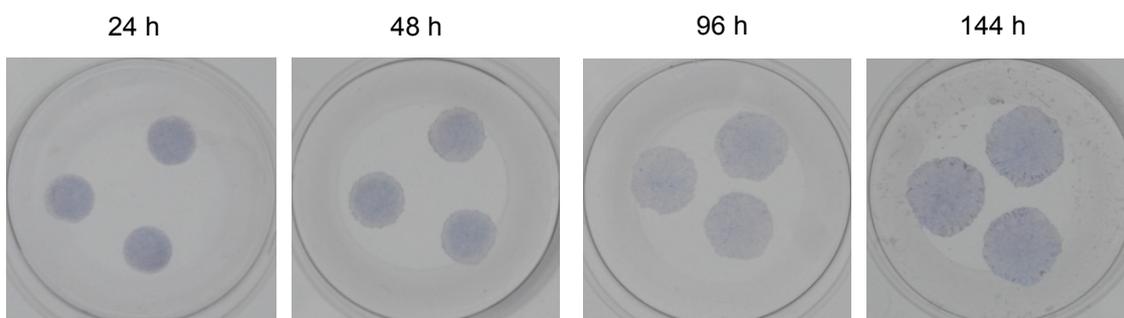


Abb. 6: exemplarischer Verlauf eines Migrations-Assay für AT₁₀₀ von 24 – 144 h (Hämalaun-Färbung)

3.2.3. Scratch-Wound-Assay (Gesamtwundheilung)

Die Wundheilung der Hornhaut geschieht nicht alleine durch Proliferation oder Migration, sondern durch eine Kombination beider Vorgänge. Zur Überprüfung der Gesamtwundheilung unter Serum-AT wurde ein Scratch-Wound-Assay durchgeführt.

Als Vergleichswert wurden 50 Ausgangswerte an den gesetzten „Wunden“ im Zellrasen erhoben und gemittelt (0 h = 639 µm). Im Folgenden wurden pro Testabschnitt und Proband jeweils zehn Messungen durchgeführt. War nach 24h mit AT₁₀₀ die Wunde voll verschlossen, so war sie im Mittel bei AT₅₀ zu

94,75% bzw. bei AT₂₀ zu 84,18% verschlossen. Auch hier zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den Messungen nach Inkubation mit Serum am Entnahmetag, nach sieben Tagen, drei Monaten und sechs Monaten (AT₁₀₀: p = 1,0 / AT₅₀: p = 0,07 / AT₂₀: p = 0,97). Bei den als Kontrollen verwendeten Tränenersatzmitteln Hylovision und Artelac zeigte sich keine Tendenz zum Verschluss der Wunden und z.T. starben und lösten sich die Zellen ab.

	0h	0 Tage		7 Tage		3 Monate	6 Monate
		12 h	24 h	12 h	24 h	24 h	24 h
AT ₁₀₀	639 ± 78,6	174,5 ± 97,3	verschlossen	189 ± 117,1	verschlossen	verschlossen	verschlossen
AT ₅₀		215 ± 77,8	19 ± 41,3	256,5 ± 86,6	18 ± 46	53,2 ± 53,8	44 ± 54,2
AT ₂₀		305,5 ± 90,1	124 ± 97,6	316 ± 52,8	49,5 ± 58,9	112,5 ± 68,9	117 ± 68,4

Tabelle 13: Gesamtwundheilung: Ausgangswert 0 h in µm; Messpunkt nach 12 bzw. 24 h (MW) ± STABW (n=10)

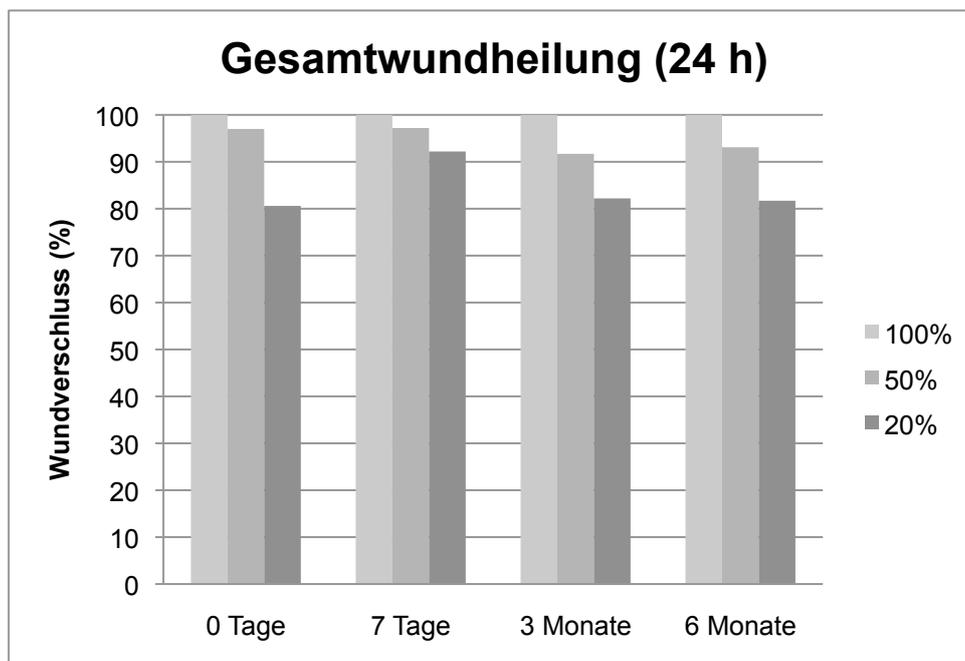


Abbildung 7: Gesamtwundheilung nach 24 h; Wundverschluss in % (100% = Wunde verschlossen / n=10)

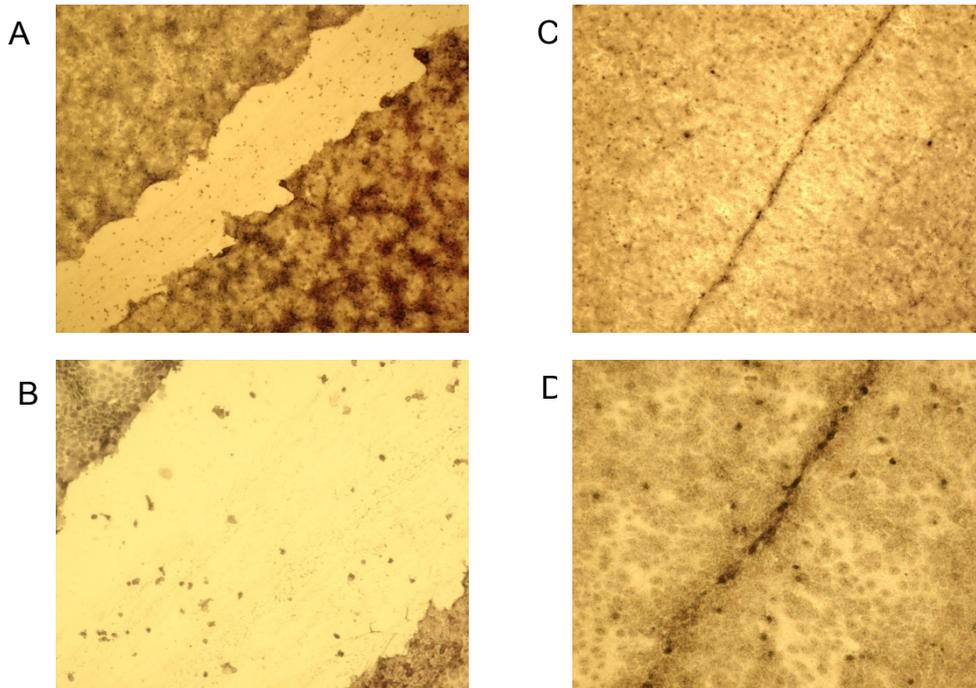


Abb. 8: **A** (2,5x Vergrößerung) & **B** (10x) zeigen die „Wunde“ zum Zeitpunkt 0h; **C** (2,5x) & **D** (10x) zeigen die verschlossene Wunde nach 24 h Inkubation mit AT₁₀₀ (100% Serum)

3.3. Sterilkontrolle

Die Sterilität der Serum-Augentropfen wurde mit Hilfe von Kulturfläschchen auf aerobe und fakultativ anaerobe Mikroorganismen überprüft. Es wurden pro Testperson zwei Proben genommen. Die erste wurde ab dem Entnahmetag für eine Woche im Institut für Mikrobiologie inkubiert, die zweite nach einwöchiger Lagerung bei +6°C ebenfalls für eine Woche kontrolliert. Keine der Serumproben zeigte ein bakterielles Wachstum.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es primär zu überprüfen, ob Serumaugentropfen auch nach einer Lagerung über eine Woche bei +4°C und über sechs Monate bei -20°C weiterhin als Therapeutikum für die Keratoconjunctivitis Sicca eingesetzt werden können. Sekundäre Ziele waren es, einen Serumbestandteil zu finden, der einen Vorhersagewert über die Wundheilungsstabilität des Serums nach Lagerung hat und damit für Qualitätskontrollen besonders geeignet wäre, und zu zeigen, dass eine Verdünnung der Augentropfen die Lagerstabilität nicht beeinflusst.

1) Kann die wundheilungsfördernde Wirkung von Serum-AT durch Lagerung bei +4°C oder -20°C erhalten bleiben (Stabilitätsnachweis)?

Die Effektivität von Serum-AT wurde in vielen experimentellen und klinischen Studien untersucht und stellt eine sinnvolle zusätzliche Therapie bei schwer trockenem Auge dar [Geerling und Seitz 2008]. In Deutschland werden jährlich mehr als 1000 Patienten auf diese Weise behandelt. Hauptindikationen sind der persistierende Epitheldefekt, Ulcus corneae und die Keratokonjunktivis Sicca [Kasper et al. 2008]. Augentropfen aus Eigenserum bieten den Vorteil, dass sie der physiologischen Tränenflüssigkeit sehr ähneln. Sie können nach dem Protokoll von Liu et al. relativ einfach hergestellt werden und liegen preislich auf dem Niveau von künstlichen Tränenersatzmitteln bei ungefähr 2,50 € pro Tagesdosis [2005]. Nachteilig ist die mögliche Übertragung von Infektionserkrankungen auf das herstellende und ggf. anwendende Personal sowie bei Verwechslung auf Mitpatienten. Eine Kontraindikation stellt eine aktive mikrobielle Erkrankung der Hornhaut dar [Geerling et al. 2008].

Bisher wurde nach Tsubota et al. angenommen, dass Serum-AT bis zu einem Monat bei 4°C und bis zu drei Monate bei -20°C gelagert werden können [1999]. Bradley et al. konnten zeigen, dass Faktoren wie EGF und TGF- β_1 in Serum-AT stabil bleiben, wenn man sie bis zu sechs Wochen im Gefrierschrank oder bis zu 24 h bei Raumtemperatur lagert, während die Substanz P, die v.a. die Migration von Epithelzellen unterstützt, schon nach 24 h bei 4°C signifikant

reduziert ist [2009]. Deshalb kann man sagen, dass die Tropfen in geringen Dosen abgefüllt, vom Patienten nach dem Auftauen bei max. 4°C gelagert und innerhalb von 24 h aufgebraucht werden sollten, um die Effektivität der Therapie zu garantieren. Mit Hilfe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die getesteten Inhaltsstoffe, sondern auch deren Aktivität erhalten bleibt. Die Lagerung im Kühlschrank für sieben Tage bzw. im Gefrierschrank für bis zu sechs Monaten ist also möglich. Die Parameter der klinischen Chemie und die Werte der in eigener Regie durchgeführten ELISA für EGF und Fibronectin zeigten keine signifikanten Schwankungen über den Studienzeitraum. Ebenso ergab die funktionelle Testung der Proliferation und der Gesamtwundheilungspotenz der Seren in einem Zellkulturmodell unter Verwendung von immortalisierten Hornhautepithelzellen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ausgangswerten und den Werten nach sieben Tagen oder sechs Monaten Lagerung. Lediglich der Kolonie-Dispersions-Assay, der zu Überprüfung der Migrationstendenz verwendet wurde, zeigte in allen Konzentrationen einen signifikant kleineren Zellrasen nach 144 h Inkubation und für AT_{100} nach 48 h für die sechs-Monats-Proben. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass aufgrund der geringen Probenmenge kein Wechsel des Serums nach 48 h erfolgen konnte. Klinisch wird täglich eine neue Tropfflasche aufgetaut, sodass der in-vitro beobachtete Effekt am Patienten nicht zu erwarten ist. Zu allen anderen Zeitpunkten ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Selbst ein geringer Konzentrationsverlust der wundheilungsfördernden Inhaltsstoffe wäre darüber hinaus evtl. aufgrund der hohen Applikationsrate, ein Patient trägt mehrmals täglich frische Tropfen und damit auch frische Zytokine usw. auf die Augenoberfläche auf, ohne Effekt auf den Nutzen der Therapie.

Für den Patienten bietet die verlängerte Lagerung über sechs Monate den Vorteil, dass nur zweimal im Jahr Serum-AT in einem autorisierten Institut hergestellt werden müssten. Des weiteren entstünden geringere Kosten für die teilweise weite Anreise auf Seiten des Patienten und für Materialien und Personal in den Kliniken. Der Preis für eine zwei-Monats-Charge von Tagesdosen AT_{20} liegt z.B. in der Universitätsklinik Lübeck bei 153,60 € [Geerling und Hartwig 2002]. Eine Produktion für sechs Monate spart durch

geringeren Personal- und Materialaufwand zehn Prozent und evtl. mehr an Kosten ein.

Die Lagerung der Serum-AT über eine Woche bei +6°C würde größere Einzeldosen erlauben. Dagegen sprechen jedoch der oben genannte Abbau der Zytokine und ein höheres Risiko der Kontamination mit Bakterien der Tropffläschchen. Sauer et al. [2004] konnten zeigen, dass unkonservierte Augentropfen bei Kühlschranktemperatur bis zu vier Tage ohne bakterielle Besiedlung möglich ist, während nach einer Woche erste Staphylokokken auftauchten. Es empfiehlt sich also v.a. aufgrund des Zerfalls der Zytokine die Verwendung von Tagesdosen.

Die Kontrolle der oben beschriebenen Ergebnisse durch klinische Studien mit größeren Fallzahlen steht noch aus und könnte neben der Lagerfähigkeit auch noch einmal die Effektivität der Serum-AT untermauern. Weiterhin könnte überprüft werden, ob eine verlängerte Lagerung im klinischen Alltag umsetzbar und praktikabel ist.

2a) Wird die Stabilität der Serum-AT bei Lagerung durch eine Verdünnung beeinflusst?

Serum-AT werden in Verdünnungen z.B. mit BSS oder unverdünnt eingesetzt. Poon et al. [2001] verglichen 100% mit 50% Serum und kamen zum Schluss, dass die höhere Konzentration die Wundheilung besser unterstützte. Demgegenüber sind die Vorteile einer Verdünnung zu 20% die geringere Viskosität und das geringe Blutvolumen zur Herstellung [Lopez-Garcia et al. 2007]. Da v.a. 20% Serum-AT als Dauermedikation eingesetzt werden und der Patient zu Hause für die Lagerung über längere Zeit verantwortlich ist, sollte es hier nicht zu einer verminderten Wirkung nach Lagerung im Gefrierfach bei -20°C kommen. In dieser Arbeit wurde 100%, 50% und 20% Serum getestet. Je höher der Gehalt an Serum war, desto höher war die Konzentration der enthaltenen Stoffe und desto höher waren die Werte für die funktionellen Tests. Es kam weder durch die Lagerung bei 6°C noch bei -20°C zu einem signifikantem Abfall der Proliferation und des Scratch-Wound-Assay-Ergebnis. Die hier verwendete Verdünnung mit einer BSS-Spüllösung zeigte keinen Einfluss auf die Lagerfähigkeit der Proben.

2b) Gibt es einen „Marker“ im Serum dessen Quantität einen Vorhersagewert für die Wundheilungseffektivität des Serums nach Lagerung hat und damit für Qualitätskontrollen besonders geeignet wäre?

Ein geeigneter Qualitäts-Marker sollte entweder selbst eine wichtige Rolle in der Heilung und Regeneration des erkrankten Auges spielen oder eine zuverlässige Aussage über die Stabilität wichtiger Faktoren geben können. Dieser Marker würde in der Herstellung und Kontrolle von Serum-AT routinemäßig bestimmt werden, weshalb er schnell, einfach und kostengünstig durchzuführen sein sollte.

Da keiner der funktionellen Tests einen signifikanten Rückgang in Kombination mit einer signifikanten Konzentrationsabnahme eines der gemessenen Inhaltsstoffes wie z.B. Vitamin A zeigte, konnte hieraus kein Parameter als Kontrollmarker ausgewählt werden. Die im Folgenden dargestellte Auswahl wurde nicht anhand der vorausgegangenen Tests, sondern anhand der Bedeutung des Faktors für die Integrität der Augenoberfläche, der entstehenden Kosten und der Durchführbarkeit erstellt.

Der Epidermale Wachstumsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei Proliferation und Migration von Hornhautepithelzellen [Klenkler et al. 2007]. EGF wird mittels ELISA bestimmt. Erstens ist dies ein sehr kostspieliges Verfahren. Zweitens im Vergleich zu anderen Methoden eher aufwendig. Drittens ist die Bestimmung von EGF in den meisten Laboratorien kein Standardverfahren. Viertens müssen die Proben verdünnt werden, was eine gewisse Fehleranfälligkeit nach sich zieht. Aus diesen Gründen ist die Bestimmung der Konzentration von EGF oder anderer Wachstumsfaktoren/Proteinen mittels ELISA weniger geeignet.

Dem gegenüber würde sich die kombinierte Kontrolle von Vitamin A & E bzw. die Messung der Albuminkonzentration anbieten. Alle drei Faktoren sind wichtig für das Auge. So wird z.B. Albumin auch alleine als Tränenersatzmittel eingesetzt und es konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass Albumin die Apoptose der Hornhautepithelzellen unterdrückt und damit einen therapeutischen Effekt auf das Trockene Auge hat [Higuchi et al. 2007]. Retinol wird in den Tränendrüsen gespeichert und zählt zu den Bestandteilen der Tränenflüssigkeit [Ubels und MacRae 1984].

Ein Vitamin-A-Mangel kann zum Untergang von Becherzellen führen und es kommt zu einer verstärkten Keratinisierung und Metaplasie der Kornea und

Konjunktiva. Kima et al. konnten zeigen, dass der Einsatz von 0,05% Vitamin-A-Tropfen eine signifikante Verbesserung z.B. der BUT und des Schirmer-Test im Vergleich zur alleinigen Therapie mit unkonservierten Tränenersatzmitteln bringt [2009]. Retinol ist also wie Albumin ein essentieller Bestandteil von autologen Serum-AT. Vit. E schützt Vit. A und ist damit ebenfalls ein wichtiger Faktor. Beide können mittels HPLC auf einmal getestet werden.

Der Aufwand für die Qualitätskontrolle muss in einem sinnvollen Verhältnis zur Ersparnis der halbjährigen Lagerung liegen. Während die Messung von Albumin mit weniger als einem Euro sehr günstig ist, liegen die Kosten für die Bestimmung der Vitamine zwischen fünf und zehn Euro. Beide Vorgehensweisen sind routinemäßige Methoden und können einfach und schnell in den Laboratorien für klinische Chemie durchgeführt werden.

Um jedoch diese Frage abschließend zu klären, müssen weitere Studien folgen. Die untersuchten Parameter stellen nur eine Auswahl dar und es gibt noch weitere Inhaltsstoffe von Serumaugentropfen, z.B. weitere Zytokine wie NGF oder Substanz P, die zur Kontrolle herangezogen werden könnten. Auch die Durchführung der o.g. Versuche über einen Zeitraum von zwölf Monaten könnte weitere Erkenntnisse geben und einen Kontrollmarker erbringen.

Abschließend soll noch auf die Bestimmung der Restzellzahl und die Sterilkontrollen eingegangen werden. Diese beiden Parameter haben klinisch eine wichtige Funktion in der Qualitätssicherung. Da es keine Richtlinie für die Restzellzahl im Serum-AT gibt, sollen hier die Vorgaben für gefrorenes Frischplasma gelten. Die gemessene Zellzahl für Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten lag deutlich unterhalb der Richtlinienwerte. Man kann von einer hohen Reinheit sprechen. Das verwendete Herstellungsprotokoll von Liu et al. [2005] mit einer starken Zentrifugation garantiert ein zellarmes Präparat.

Die Herstellung wurde nicht unter Reinstraumbedingungen vorgenommen sondern unter Sterilbedingungen, d.h. es wurde unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Handschuhen gearbeitet. Es konnte kein Wachstum von aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen festgestellt werden. Nicht nur die Sorgfalt bei der Herstellung, sondern auch bei der Lagerung spielt hier eine Rolle. Die Aufbewahrung angebrochener Augentropffläschchen sollte

deshalb nicht nur wegen der instabilen, epitheliotropen Faktoren sondern auch wegen der Sterilität kühl erfolgen.

5. Zusammenfassung

Einleitung

Augentropfen aus autologem Serum (AT) werden seit ca. zehn Jahren erfolgreich in der Therapie von Erkrankungen des äußeren Auges eingesetzt [Yamada et al. 2008]. Die relativ aufwendige individuelle Herstellung sowie die derzeitigen gesetzlichen Regularien schränken bisher die flächendeckende Versorgung der Patienten mit AT ein. Der Nachweis der Funktionalität der AT nach einer verlängerten Haltbarkeit von sieben Tagen bei +4°C bzw. sechs Monaten Lagerungen bei -20°C könnte die Logistik vereinfachen und somit die Versorgungssituation der Patienten verbessern. In dieser Studie wurde die Stabilität verschiedener Inhaltsstoffe und des wundheilungsfördernden Einflusses von AT in verschiedenen Verdünnungsstufen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen untersucht.

Materialien und Methodik

Nach Vorliegen des Votums der Ethikkommission der Universität Würzburg wurde von zehn gesunden Männern 300 ml Vollblut in sterilen Serummonovetten abgenommen. Die Präparation erfolgte entsprechend dem Protokoll von Liu et al. [2005]. Die AT wurden unverdünnt (AT₁₀₀), bzw. mit Balanced Saltsolution (BSS) für die Ophthalmologie auf 50% (AT₅₀) oder 20% (AT₂₀) verdünnt und bei 6° für 7 Tage bzw. bei -20° für 3 und 6 Monate gelagert. Die Untersuchung der Proben erfolgte am Tag der Entnahme, nach 7 Tagen, 3 Monaten und 6 Monaten. Die Konzentration von Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), Fibronectin, Vitamin A und E, IgA und Albumin wurden mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Photometrie oder Turbidimetrie gemessen. Für den Nachweis der Funktionalität der AT in vitro wurden immortalisierte Hornhautepithelzellen (HCE-Zellen) verwendet. Folgende Parameter wurden untersucht: Proliferation mit Hilfe eines lumineszenzbasierten ATP-Assays, Migration im Kolonie-Dispersions-Assay und Wundheilungspotenz mittels Scratch-Wound-Assay.

Ergebnisse

Die untersuchten laborchemischen Parameter zeigten während der Lagerung nur geringe Schwankungen und keinen signifikanten Unterschied zwischen den frischen, den sieben Tage und den sechs Monate gelagerten Proben. Mit dem Kolonie-Dispersions-Assay wurde die Migrationsfähigkeit der HCE-Zellen über max. 144 h erfasst. Zu jedem Messpunkt und bei jeder Konzentration war eine Zunahme des Durchmessers der Zellrasen zu beobachten, außer für sechs Monate gelagerte AT₂₀. Die stärkste Dispersionsstendenz zeigte die Zellen für AT₁₀₀. Auch für den Scratch-Wound-Assay und ATP-Assay konnte keine signifikante Änderung zum frischen Ausgangsmaterial gezeigt werden.

Konklusion

1. Die Konzentration der untersuchten Inhaltsstoffe und der wundheilungsfördernde Einfluss von AT ist nach sieben Tagen bei +4°C bzw. nach sechs Monaten Lagerung bei -20°C nicht signifikant verändert.
2. Es konnte kein eindeutiger Parameter für die Kontrolle der AT gefunden werden. Aufgrund der Bedeutung für die Augenoberfläche und aufgrund der einfachen Nachweismethode bietet sich die Überwachung von Albumin oder Vitamin A & E an. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die verwendete Verdünnung ebenfalls keinen Einfluss auf die Lagerfähigkeit hat.
3. Weitere Studien über andere trophische Faktoren oder über einen Zeitraum bis zu 12 Monaten sollten folgen. Auch die klinische Überprüfung der gefundenen Ergebnisse steht aus.

6. Literaturverzeichnis

American Academy of Ophthalmology; Preferred Practica Pattern: Dry Eye Syndrome (2003)

Becker W, Rapp W, Schenk HG, Störiko K: Methoden zur quantitative Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation; *Z Klin Chem Klin Biochem* (1968) 6:113-122

Bradley JC, Simoni J, Bradley R, McCartney D, Brown M: Time- and Temperature-Dependent Stability of Growth Factor Peptides in Human Autologous Serum Eye Drops; *Cornea* (2009) 28:200-205

Brewitt H, Zierhut M: Physiologie des Tränenfilms. *Ophthalmothek, Trockenes Auge* 33-41, Dr. Reinhard Kaden Verlag, Heidelberg (2001)

Brignole F, Pisella PJ, De Saint Jean M, Goldschild M, Goguel A Baudouin C: Flo cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A; *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2001) 42:90-95

Bundesanzeiger (BAnz) Nr.92 vom 19.5.2007, S. 5075f

Cursiefen C, Jacobi C, Dietrich T, Kruse FE: Aktuelle Therapie des trockenen Auges; *Ophthalmologe* (2006) 103:18-24

Dilly P: Conjunctival Cells, Subsurface Vesicles and Tear Film Mucus; *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear*. (Hrsg.: v. Holly, F.J.), Dry Eye Institute, Lubbock (TX) 1986

Dogru M, Tsubota K: New Insights into the Diagnosis and Treatment of Dry Eye; *Ocul Surf* (2004) 2:59-75

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green; *Clin Chim Acta* (1971) 31:87-96

Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, Peters jr T, Schaffer R: A candidate reference method for determination of total protein in serum; *Clin Chem* (1981) 27:1642-1654

Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE: Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca; *Arthritis Rheum* (1984) 27:459-61

Garrett Q, Simmons P, Xu S, Vehige J, Zhao Z, Ehrmann K, Willcox M: Carboxymethylcellulose binds to human corneal epithelial cells and is modulator of corneal epithelial wound healing; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (2007) 1559-1567.

Geerling G, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT: Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells; *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2001) 42:948 –956

Geerling G, Grus F, Seitz B, Hartwig D, Schirra F: Arzneimittelrechtliche Erlaubnis zur Herstellung von Serum-Augentropfen; *Ophthalmologe* (2008) 105:623-631

Geerling G, Hartwig D: Autologe Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche; *Ophthalmologe* (2002) 99:949-959

Geerling G, Honnicke K, Schroder C: Quality of salivary tears following autologous submandibular gland transplantation for severe dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (1999) 237:546–553

Geerling G, MacLennan S, Hartwig D: Autologous Serum Eye Drops For Ocular Surface Disorders; *Br J Ophthalmol* (2004) 88:1467-1474.

Geerling G, Seitz B: Blutprodukte zur Therapie von Augenerkrankungen; *Ophthalmologie* (2008) 105:621-622

Geerling G, Unterlauff JD, Kasper K, Schrader S, Opitz A, Hartwig D: Eigenserum und alternative Blutprodukte zur Behandlung von Augenerkrankungen; *Ophthalmologie* (2008) 105:623-31

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Immunology*, 5th ed., (2003) 148-150. W. H. Freeman, New York

Hanisch KT, Neppert B, Geerling G: Gas permeable scleral lenses as a conservative treatment option for extreme corneal ectasias and severe dry eye; *Ophthalmologie* (2005) 102:387-392

Herminghaus P, Hartwig D, Wedel T, Dibbelt L, Geerling G: Epitheliotrophe Kapazität von Serum- und Plasma-Augentropfen – Einfluss der Zentrifugation. *Ophthalmologie* 101 (2004) 998-1005.

Higuchi A, Ueno A, Shimmura S, Suematsu M, Dogru M, Tsubota K: Albumin Rescues Ocular Epithelial Cells from Cell Death in Dry Eye; *Current Eye Research* (2007) 32:83-88

Holly F.J., Lemp M.A.: Tear physiology and dry eyes. *Surv. Ophthalmol.* (1977) 22:69-87

Jacobi C, Dietrich T, Cursiefen C, Kruse FE: Das trockene Auge. Aktuelle Konzepte zu Klassifizierung, Diagnostik und Pathogenese; *Ophthalmologie* (2006) 103:9-17

Kasper K, Godenschweger L, Hartwig D, Unterlauff JD, Seitz B, Geerling G: Zum Stand der Anwendung von Eigenserum-Augentropfen in Deutschland; *Ophthalmologie* (2008) 105:644–649

Kima EC, Choia JS, Joo CK: A Comparison of Vitamin A and Cyclosporine A 0.05% Eye Drops for Treatment of Dry Eye Syndrome; *American Journal of Ophthalmology* (2009) 147:206-213

Klenkler B, Sheardown H, Jones L: Growth Factors in the Tear Film: Role in Tissue Maintenance, Wound Healing and Ocular Pathology; *The Ocular Surface* (2007) 5:228-239

Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K, Geerling G: Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations; *Inv Ophthalmol Vis Sci* (2006) 47 (6) 2438-2444.

Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G: An optimized protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefe`s Arch Clin Exp Ophthalmol* (2005) 243:706-14.

Lopez-Garcia JS, Garcia-Lozano I, Rivas L, Martinez-Garchitoena J: Use of autologous serum in ophthalmic practice. *Arch Soc Esp Oftalmol* (2007) 82:9-20

Luo L, Li DQ, Doshi A, Farley W, Pflugfelder SC: Experimental dry eye induced expression of inflammatory cytokines (IL-1 α and TNF- α), MMP-9, and activated MAPK by corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2003) 44:E-Abstract 1026

Lüllmann-Rauch R.: Histologie. 6. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003)

Kaercher T, Welt R: Lipidstörungen des Tränenfilms. *Z. prakt. Augenheilkd.* (1998) 19:171-180

Milne DB, Botnen J: Retinol, α -tocopherol, lycopene and α - and β -carotene simultaneously determined in plasma bei isocratic liquid chromatography. *Clin. Chem* (1986) 32:874-876.

Moore JC, Tiffany JM: Human ocular mucos. Chemical studies. *Exp. Eye. Res.* (1981) 33:203-212

Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D: Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögrens syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* (1999) 19:201-211

Poon AC, Geerling G, Dart JKG, Fraenkel G, Daniels JT: Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in-vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* (2001) 85:1188-1197.

Sauer R, Blüthner K, Seitz B: Sterilitätskontrolle von unkonservierten Eigenserumtropfen bei therapieresistenten Hornhautepitheldefekten. *Ophthalmologe* (2004) 101:705-709

Schargus M, Geerling G: Das „feuchte“ trockene Auge; *Ophthalmologe* (2009) 1-6

Schulze S, Sekundo W, Kroll P: Vergleich von Eigenserum und Hyaluronsäure zur Behandlung kornealer Erosiones nach Vitrektomie bei Diabetikern; *Ophthalmologe* (2005) 102:863–868

Stolze HH: Diagnostik des Trockenen Auges in der Praxis. *Ophthalmothek, Trockens Auge* 63-79, Dr. Reinhard Kaden Verlag, Heidelberg (2001)

Tsubota K, Eiki Goto, Hiromi Fujita, Masafumi Ono, Hiroko Inoue, Ichiro Saito, Shigeto Shimmura: Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* (1999) 83:390–395

Ubels JL, MacRae SM: Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits; *Curr Eye Res* (1984) 3:815– 822

Vowells S, Cadden M, Wagner C, Nuñez R: Detection and Enumeration of Residual White Blood Cells in Leucoreduced Red Blood Cell and Platelet Products Using the LeucoCOUNT Kit. Becton, Dickinson and Company (1998)

Wolff E: Mucocutaneous junctions of lid-margin and distribution of tear fluid. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* (1946) 66:291-308

Yamada Ch, King KE, Ness PM: Autologous serum eyedrops: literature review and implications for transfusion medicine specialists. *Transfusion* (2008) 48:1245-1255

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Böck, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit diese Arbeit durchführen können zu dürfen.

Meinen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Gerd Geerling, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie für die Übernahme des Koreferates. Danke auch für die große Hilfe und Geduld bei der Erstellung des Manuskripts „Epitheliotrophic stability of autologous serum eye drops after prolonged storage of 6 months“.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Opitz und Herrn Karsten Kasper für die fortwährende engagierte Betreuung bei der Durchführung des praktischen und theoretischen Teils dieser Arbeit. Bei Problemen jeder Art standen mir beide mit tatkräftiger Unterstützung und wertvollen Ratschlägen zur Seite und konnten mich immer wieder neu motivieren und begeistern.

Weiterhin sei allen Mitarbeitern des Labors der Augenklinik, hier besonders Frau Doris Deininger, und des Institutes der klinischen Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg für die Einführung in die Geräte und Techniken, sowie für die Hilfestellung bei auftretenden Problemen gedankt.

Mein innigster Dank gilt jedoch meinen Eltern, meinem Bruder Carsten und meiner Schwester Cindy ohne deren Unterstützung, Fürsorge und Geduld diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.