

Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. M. Seyfarth

**Epitheliotrophe Kapazität von Serum -
und Fruchtwasser auf immortalisierte
Korneaepithelzellen
– Eine In- vitro- Studie –**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Birgit Frank

aus Staaken

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: **Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Hartwig**

2. Berichterstatter: **Priv.-Doz. Dr. med. Christopher Altgaßen**

Tag der mündlichen Prüfung: **14.01.2011**

Zum Druck genehmigt: **14.01.2011**

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Die Augenoberfläche	8
1.2 Ernährung der Augenoberfläche	8
1.3 Zusammensetzung und Funktion der Tränen	9
1.4 Erkrankungen der Augenoberfläche	10
1.5 Zusammensetzung und Funktion von Fruchtwasser	12
1.6 Idee/ Entstehung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Serumgewinnung	15
2.2 Fruchtwasserproben	15
2.3 Zellkulturmodell	15
2.4 Verwendete Medien	16
2.4.1 Nährmedium Shem X	16
2.4.2 Minimalmedium	16
2.4.3 Hydroxyurea- Medium	16
2.5 Proliferation: ATP- Assay	16
2.6 Migration: Kolonie Dispersions- Assay	17
2.7 Zelltod: Apoptose- Assay	18
2.7.1 LDH- Messung – Nekrose	19
2.8 Inhaltsstoffbestimmung in Serum und Fruchtwasser	20
2.8.1 EGF, TGF- β 1, Fibronectin	20
2.8.2 Vitamine	22
2.8.3 Glukose, Albumin, Gesamtprotein	23
2.8.4 Messung chemischer Eigenschaften	23
2.9 Datenauswertung und statistische Methoden	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Chemische Eigenschaften	25
3.1.1 Osmolarität	25
3.1.2 pH- Wert	25
3.2 Inhaltsstoffbestimmung	25
3.3 Proliferation: ATP- Assay	26
3.3.1 Dosis- Wirkungs- Untersuchung	26
3.3.2 Zeit- Wirkungs- Untersuchung	28

3.4	Migration: Kolonie- Dispersions- Assay	29
3.4.1	Dosis- und Zeit- Wirkungs- Untersuchung	29
3.5	Zelltod: Apoptose- Assay	33
3.5.1	Zelltod: Nekrose- Beurteilung	34
4	Diskussion	36
4.1	Chemische Eigenschaften von Serum und Fruchtwasser	37
4.1.1	pH- Wert	38
4.1.2	Osmolarität	38
4.2	Endpunktassays	39
4.3	Zelltodanalyse	45
5	Zusammenfassung	48
	Literaturverzeichnis	57
6	Tabellen	58
6.1	Übersicht zu den Messergebnissen	58
6.2	Übersicht zu den Reagenzien und Materialien	62
7	Danksagung	65
8	Lebenslauf	66

Abbildungsverzeichnis

3.1	Darstellung der Ergebnisse des Proliferationsassays nach 6h und 24h. .	27
3.2	Ergebnisübersicht des Proliferationsassays nach Inkubation über 48h. .	27
3.3	Übersicht über Proliferation nach Inkubation mit unverdünnten Test- substanzen.	29
3.4	Zellrasen nach vollständiger Konfluenz, Nullpunktbestimmung	29
3.5	Migration nach 24 und 48 h	30
3.6	Migration nach 96h	31
3.7	Zellrasen nach 24 h Inkubation mit Serum und FW	31
3.8	Zellrasen nach 48 h Inkubation mit Serum und FW	32
3.9	Zellrasen nach 96 h Inkubation mit Serum und FW	32

Tabellenverzeichnis

1.1	Vergleich der biochemischen Eigenschaften von unstimulierten Tränen und Serum	10
3.1	Biochemische Eigenschaften von unbehandeltem Serum und Fruchtwasser	25
3.2	Zelltodmessung nach 24 und 48 h Inkubationszeit	33
6.1	Proliferation 6h	58
6.2	Proliferation 24h	58
6.3	Proliferation 48h	59
6.4	Migration 24h	59
6.5	Migration 48h	59
6.6	Migration 96h	60
6.7	Apoptose- Messung SEM 24h	60
6.8	Apoptose- Messung SEM 48h	60
6.9	Apoptose- Messung 24 und 48h	61
6.10	LDH- Messung 24h	61
6.11	LDH- Messung 48h	61
6.12	Materialien	62
6.13	Chemikalien	63
6.14	Geräte	64

Abkürzungsverzeichnis

AT	Augentropfen
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Benzalkoniumchlorid
BSS	Balanced Salt Solution
BSA	Bovine Serum Albumin
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
FBS	Foetal Bovine Serum
FW	Fruchtwasser
h	Stunden
HCE	Humanes Cornea Epithel
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KKS	Keratokonjunktivitis sicca
MEM	Minimal Essential Medium
MM	Minimal Essential Medium
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat Buffer Solution
rpm	Umdrehung pro Minute
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean
TGF- β	Transforming Growth Factor- β

1 Einleitung

1.1 Die Augenoberfläche

Die Augenoberfläche, bestehend aus Kornea und Konjunktiva, bildet mit der Tränenflüssigkeit eine funktionelle Einheit. Die Kornea ist aus folgenden 5 Schichten aufgebaut: Epithel, Bowman- Membran, Stroma, Descemet- Membran und Endothel. Die Durchsichtigkeit der Hornhaut ist durch die Avaskularität, die regelmäßige Anordnung der Kollagenfibrillen und durch den relativ niedrigen Wassergehalt von nur 75 % bedingt [38]. Bei Epithelschädigungen oberhalb der Basalzellschicht erfolgt die Regeneration des Epithels innerhalb von Stunden bis Tagen durch die Basalzellen des Epithels. Sind bei einer Epithelschädigung die Basalzellen mitbetroffen, so erfolgt die Regeneration langsamer vom Limbus her, da hier die Stammzellen als “Reservoir” angesiedelt sind. Die Zerstörung der Stammzellen bei Verletzungen, z.B. nach Verätzung, führt zu gravierenden Heilungsstörungen mit Überwachsung von Bindehaut auf die Kornea. Endotheldefekte hingegen können nur durch Ausbreitung benachbarter, intakter Endothelzellen geschlossen werden.[17]

Die Konjunktiva ist eine dünne, durchsichtige Schleimhautschicht, die über der Sklera liegt und aus mehrschichtigem Zylinderepithel und Bindegewebe besteht. Sie besteht aus drei Anteilen: Conjunctiva tarsi, Fornix conjunctivae und Conjunctiva bulbaris. Im Zylinderepithel befinden sich zahlreiche Becherzellen, deren Schleim die Haftung des Tränenfilms auf der Korneaoberfläche bewirkt. Daneben gibt es die akzessorischen Krause- Drüsen im konjunktivalen Bindegewebe, die für die basale Tränenproduktion zuständig sind. Außerdem können neben den Becherzellen noch andere Zellarten im und unter dem Epithel, wie Lymphozyten und Langerhans Zellen, vorliegen.[17]

1.2 Ernährung der Augenoberfläche

Der Nährstoffbedarf der Kornea erfolgt zu 90 % durch das Kammerwasser. Damit wird vor allem der Bedarf an Glukose, Elektrolyten und Aminosäuren abgedeckt. Für den Aufbau und die Erhaltung der Augenoberfläche sind zusätzlich noch höhermolekulare Proteine wie Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, PDGF, TGF- β) und Fibronektin nötig. Diese erreichen die Augenoberfläche mit Hilfe des wässrigen Tränenanteils. Dadurch

wird die Proliferation, Migration und Differenzierung der Epithelien von Kornea und Konjunktiva unterstützt. Die Energie für diese Zellaktivitäten wird aus Adenosin Triphosphat (ATP) gewonnen. Die ATP- Synthese erfolgt durch den aeroben Glukoseabbau. Hierfür ist die Glukose aus dem Kammerwasser und der durch die Zellschichten hindurch diffundierende Sauerstoff aus der Luft essentiell. Das die Zelladhäsion beeinflussende Fibronektin wird aus dem Plasma durch erhöhte Permeabilität der Konjunktivalgefäße bereit gestellt.

Die Erhaltung eines normalen Epithels der Augenoberfläche mit normalem Wachstum ist nicht nur von der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren abhängig, sondern auch von einer adäquaten Menge an Vitamin A. Vitamin A- Mangel kann zur Veränderung der Augenoberfläche führen, im Sinne einer Keratinisierung und Aufweichung der Zell-Zell- Kontakte [60]. Bei Mangelernährung der Augenoberfläche können Metaplasien des Oberflächenepithels entstehen, welche durch die Zerstörung der Stammzellen zur Regenerationsunfähigkeit des Epithels und darauf mit folgender Überwachsung mit Bindegewebe führen können. Der Hauptgrund für diese Mangelernährung ist die nicht ausreichende Produktion von Tränenflüssigkeit, das Syndrom des trockenen Auges [22],[47].

1.3 Zusammensetzung und Funktion der Tränen

Die Produktion und gleichmäßige Verteilung der Tränenflüssigkeit ist unabdingbar für ein gesundes Oberflächenepithel. Tränen säubern und ernähren die Augenoberfläche und machen sie für Bulbus- und Lidbewegungen gleitfähig. Tränen bestehen aus Elektrolyten, Proteinen, Wachstumsfaktoren, Vitaminen, Aminosäuren, Glukose sowie Wasser, Mukus und Lipiden [43]. Die Proteine der wässrigen Tränenfilmphase beeinflussen die Lipidschicht und ihre biomechanischen Eigenschaften [65], z.B. das Tränen- Lipocain, das die Oberflächenspannung der Träne senkt. Der von den Becherzellen produzierte Mukus sorgt für die Haftung der Tränenflüssigkeit am Kornea- und Konjunktivaepithel sowie für die Auswaschung von Epitheldetritus und toxischen Elementen. Die Lipidschicht, die von den Meibom'schen Drüsen produziert wird, schützt vor der Verdunstung der Tränen [47]. Außerdem werden proliferationsfördernde, antiapoptotisch wirkende und die epitheliale Wundheilung fördernde Faktoren von den Tränendrüsen sezerniert. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Neuropeptide wie Substanz P und Wachstumsfaktoren wie epidermaler Wachstumsfaktor (EGF). Im Rahmen entzündlicher Prozesse werden zusätzlich Proteasen, Lactoferrin, Serum- IgA sowie weitere Immunglobuline und Komplementfaktoren in die Träne abgegeben. Diese Faktoren bewirken gemeinsam eine Opsonisierung und Phagozytose von Mikroben durch Makrophagen und Lymphozyten. Dadurch hat die Tränenflüssigkeit nicht nur benetzende und mechanisch reinigende, sondern auch epitheliotrophe und antimikrobielle

	Tränen	Serum
pH	7,4	7,4
Osmolarität (mOsm)	298	296
EGF (ng/ml)	0,2- 3,0	0,5
TGF- β (ng/ml)	2- 10	6- 33
Vitamin A (mg/ml)	0,02	46
Fibronektin (μ g/ml)	21	205

Tabelle 1.1: Vergleich der biochemischen Eigenschaften von unstimulierten Tränen und Serum [23];
EGF: epidermal growth factor, TGF- β : transforming growth factor beta

Eigenschaften [28]. In ihrer Zusammensetzung ähneln Tränen dem Serum wie Tabelle 1.1 verdeutlicht.

Obwohl es einige Unterschiede zwischen Serum und Tränen gibt, da Serum z.B. EGF, TGF β 1 und Fibronektin in höheren Konzentrationen aufweist, wird Serum als autologes Tränenersatzmittel in klinischen Studien zur Behandlung einer schweren Sicca Symptomatik und bei persistierenden Korneaepiteldefekten genutzt.

1.4 Erkrankungen der Augenoberfläche

Die Symptome der Keratokonjunktivitis sicca bestehen aus brennenden, geröteten und übermäßig tränenden Augen und Fremdkörpergefühl. Starke Schmerzen, auf Grund der ausgeprägten sensiblen Innervation der Kornea können ebenfalls hinzukommen. Die Keratokonjunktivitis sicca ist eine nichtinfektiöse Keratopathie, bei der eine Benetzungsstörung von Binde- und Hornhaut besteht. Histologisch liegt eine verminderte Tränenproduktion im Rahmen bestimmter Systemerkrankungen wie rheumatischer Arthritis und Sjögren Syndrom oder im Rahmen von atrophien bzw. destruktiven Veränderungen der Glandulae lacrimales vor. Eine weitere Ursache liegt in einer veränderten Zusammensetzung des Tränenfilms. Die Tränenfilmmzusammensetzung kann sich durch Vitamin A- Mangel, Medikamente, z.B. Ovulationshemmer, oder durch Umwelteinflüsse wie Smog ändern. Dies führt zum vorschnellen Aufreißen des Tränenfilms, wodurch die Hornhautaustrocknung verursacht wird. Diagnostiziert wird die Keratokonjunktivitis sicca über die Anamnese und klinische Untersuchung. Der Patient gibt starke Beschwerden bei meist geringen klinischen Befunden an. Bei der Untersuchung fällt die verkürzte Tränenfilmaufrisszeit von < 5 Sekunden, normal > 10 Sekunden, auf. Desweiteren imponieren bei der Spaltlampenuntersuchung die dilatierten Bindehautgefäße und die perikorneale Injektion. Zusätzlich ist an der unteren Lidkante kein Tränenfilmmeniskus nachweisbar, wodurch das Unterlid die Bindehaut in lidkantenparallelen Falten vor sich her schiebt, sogenannte Lipkofs. Im Schirmer- Test lässt sich

eine pathologisch geringe Tränensekretion nachweisen. Nach Einlegen eines Lackmuspapierstreifens in den Bereich des temporalen Unterliddrittels des Bindehautsacks für 5 Minuten wird dieser durch die Tränenflüssigkeit nur < 5 mm verfärbt, physiologisch Werte sind > 15 mm. Im Tränenfilm findet sich zäher Schleim und kleine Fäden, ausgehend von oberflächlichen Epithelläsionen. Diese Epithelläsionen lassen sich mit Fluorescein oder mit Bengalrosa anfärben. Die Therapiemöglichkeiten bestehen einerseits aus der Gabe von Tränenersatzmitteln, je nach Schweregrad der Erkrankung mit unterschiedlicher Viskosität und andererseits aus dem Verschluss der Tränenpünktchen mit Punctum Plugs. Diese sollen helfen einen besseren Tränenstau zu erreichen, um so der Austrocknung der Augen entgegen zu wirken. In schweren Fällen können die Puncta lacrimalia auch chirurgisch verödet werden. Die Prognose ist unter der Therapie gut, da eine Progression verzögert werden kann, allerdings ist eine Heilung nicht möglich [43]. Autologe Serum- Augentropfen (Serum- AT) werden bei der Keratokonjunktivitis sicca als Therapie versucht, wenn es zu schwer heilenden Epithelläsionen gekommen ist. Serum- AT hatten in In- vitro- Studien sowie in klinischen Studien eine die Proliferation und Migration von Korneaepithelzellen unterstützende Wirkung [18]. Diese Ergebnisse konnten dann in klinischen Studien nachvollzogen werden [23], [82], [83]. Diese Effekte werden auch bei der Behandlung von persistierenden Epitheldefekten, z.B. schlecht heilenden Hornhautulzera, genutzt. Unter einem Ulkus wird eine lokale Entzündung von Haut oder Schleimhaut mit in die Tiefe gehendem Substanzverlust verstanden. Es kann auf verschiedene Weise entstehen. Bei Infektionen wird es meist durch Bakterien oder Viren, seltener durch Pilze verursacht. Die häufigsten Erreger sind Staphylococcus aureus, Pneumokokken und Pseudomonas aeruginosa. Sie dringen durch Epithelläsionen in die Kornea ein und bilden ein Geschwür mit typischem Leukozytenring. Durch die ringförmige Ausbreitung bedingt, trägt es auch den Namen Ringulkus. Meist ist das Ulkus mit einer Eitersammlung in der Vorderkammer (Hypopyon) sowie mit Gefäßeinsprossung durch die Entzündung verbunden. Die klinischen Symptome zeichnen sich durch Bindehautreötung, Lichtscheuheit, Schmerzen und Lidkrampf (Blepharospasmus) aus. Das Ulkus und Hornhautinfiltrat sind makroskopisch oder mit der Spaltlampe als Trübung sichtbar, besonders gut nach Anfärbung mit Fluorescein oder Bengalrosa. Mögliche Komplikationen des Ulcus corneae sind Hornhautperforation, Hornhautverdünnung mit Ausbildung einer Descemetozele, Leukom, Hornhautstaphylom oder Narbenbildung auf der Oberfläche. Die Therapie des Ulkus besteht in der Applikation von Antibiotika- AT. Bei intraokularer Reizung, Zellen in der Vorderkammer und Hypopyon, sollte der Ziliarkörper und die Iris durch Atropintropfen in therapeutischer Mydriasis ruhig gestellt werden. Ist der Gewebedefekt großflächig oder heilt er schlecht, kann eine Deckung mit Bindehaut des Patienten oder mit Amnionmembran aus Plazenta notwendig sein [43]. Dies führt in der Regel zur schnellen Heilung, aber es bleiben Narben zurück. Bei Descemetozele oder bereits perforiertem

Ulkus ist eine Notkeratoplastik “Keratoplastik à chaud” indiziert [43]. Ulzera können auch durch Reibung bei zu lang getragenen oder verschmutzten Kontaktlinsen entstehen. Im Alter ist die zunehmende Abwehrschwäche ein verstärkender Faktor, ebenso wie die Austrocknung der Hornhaut bei bestehendem Ectropium senile, einer Schwäche des Bindegewebes, wodurch das Unterlid nach außen unten absinkt.

1.5 Zusammensetzung und Funktion von Fruchtwasser

Wurde eine Eizelle befruchtet, wird sie von der Ampulla tubae durch Zilienschlag der Flimmerzellen des Tubenepithels in den Uterus transportiert. Dort kommt es dann zur Implantation der Eizelle. Dies geschieht ab dem 6. Tag nach der Befruchtung. Bei Kontakt der Blastozyste, bestehend aus Trophoblast und Embryoblast, mit dem Endometrium wandeln sich die Trophoblastzellen in Synzytiotrophoblasten um. Das Endometrium verändert sich nach vollständiger Implantation zur Decidua graviditatis, so dass es zu keiner weiteren Menstruation und damit zur Erhaltung der Schwangerschaft kommt. Während der Implantation erfolgt neben den Differenzierungen der Trophoblasten die Bildung von Amnioblasten aus dem Ektoderm. Diese Amnioblasten bilden am 9. Entwicklungstag das Amnion aus einschichtigem, kubischem Amnionepithel, das die Amnionhöhle umschließt.

Das Amnionepithel hat vor allem in der Frühphase der Schwangerschaft, durch aktive Sekretion, einen großen Anteil an der Entstehung von Fruchtwasser. Desweiteren regelt das Amnionepithel den pH-Wert des FW. Zur Produktion von FW trägt auch der mütterliche Organismus durch Transsudation von Flüssigkeit aus dem mütterlichen Serum bei. Mit fortschreitender Schwangerschaft nimmt der Fetus zunehmenden Einfluss auf die FW- Bildung und ebenso auf die Volumenkontrolle des Fruchtwassers. Mit beginnender Nierenfunktion wird der fetale Urin ins FW abgegeben und gegen Schwangerschaftsende werden zunehmende Mengen vom Feten geschluckt und von seinem Gastrointestinaltrakt resorbiert. So besteht bei physiologischer Entwicklung ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Neubildung und der Resorption von Fruchtwasser. Untersuchungen haben gezeigt, dass gegen Schwangerschaftsende zwischen 30 und 50 Prozent des Fruchtwassers stündlich erneuert und dabei 3,5 l pro Stunde zwischen fetalem und mütterlichem Organismus ausgetauscht werden.

Die Zusammensetzung von Fruchtwasser ist, aufgrund der FW- Bildung durch Mutter und durch den Feten, interindividuell verschieden. Es hat einen Proteingehalt zwischen 0,2 und 7 g/l [78], [81] und enthält in unterschiedlichen Mengen Glukose. Der Glukosegehalt verringert sich mit fortschreitender Schwangerschaft. In der 15. bis 18. Schwangerschaftswoche schwankt er zwischen 12 bis 69 mg/dl [77]. Weitere Inhaltsstoffe sind Harnstoff, Laktat, Kreatinin, Bilirubin, Wachstumsfaktoren, Fibronectin, Vitamine, Proteohormone und Steroidhormone sowie Zellen. Bei den Zellen können

Amnionzellen, fetale Epidermiszellen sowie Epithelzellen des fetalen Verdauungs-, Respirations- und Urogenitaltraktes unterschieden werden. Der pH- Wert des Fruchtwassers liegt bei 7,0 und es hat ein spezifisches Gewicht von 1007 - 1025 g/l. Bis zur 36. Schwangerschaftswoche nimmt die Menge des Fruchtwassers zu. Es umgibt den Embryo bzw. Feten und hat neben einer nutritiven vor allem eine protektive Funktion. Es ermöglicht der Frucht die nötige Bewegungs- und Entwicklungsfreiheit und schützt gegen Außeneinflüssen wie Temperatur oder mechanischen Irritationen wie Traumata und Druck [78], [73], [72].

1.6 Idee/ Entstehung der Arbeit

Bei der Behandlung von Augenoberflächenenerkrankungen werden verschiedenste Substanzen eingesetzt, von künstlichen Tränenersatzmitteln über Amnionmembran der Plazenta bis hin zu autologen Serum- Augentropfen. Dies zeigt, wie intensiv an der bestmöglichen Therapie geforscht wurde und wird. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Entwicklung von Tränenersatzmitteln, die nicht nur gute Gleit- und Feuchtigkeitseigenschaften besitzen, sondern sich auch dadurch auszeichnen, dass sie die Proliferation und Migration der Korneaepithelzellen unterstützen. Dies sollen sie in dem Maße, dass auch Läsionen, bei denen die Basalzellschicht des Epithels defekt ist, zur Abheilung gelangen und dauerhaft verschlossen bleiben. Nach heutigem Stand der medizinischen Wissenschaft werden diese Anforderungen bisher von autologen Serum- AT am besten erfüllt. Da bereits Amnionmembran zur Defektdeckung großer, schwer heilender Kornea- und Konjunktivadefekte eingesetzt wird und dabei nicht nur eine Defektdeckung erreicht, sondern gleichzeitig ein Heilungsanreiz bietet [49], [8], lag die Überlegung nahe, dass Fruchtwasser, das in engem Kontakt zur Amnionmembran steht, eventuell ebenso eine wundheilungsfördernde Wirkung auf die Kornea haben könnte [10]. Folgerichtig berichtete im Mai 2006 Ashley Behrens von vielversprechenden Ergebnissen bei der Verwendung von Fruchtwasser- AT im American Journal of Ophthalmology unter dem Titel "Use of Topical Human Amniotic Fluid in the Treatment of Acute Ocular Alkali Injuries in Mice" [29]. Es konnte gezeigt werden, dass Fruchtwasser, ohne signifikanten Unterschied ob es aus der 16. - 18.(Gruppe 1 der Studie) oder 36.- 38.(Gruppe 2 der Studie) Schwangerschaftswoche gewonnen wurde, in den ersten sieben von 14 Behandlungstagen nach alkalischem Verätzungstrauma der Kornea an Mäusen, zu einer signifikant besseren Wundheilung mit Reepithelialisierung führte als die Behandlung mit isotoner Salzlösung, $p \leq 0,017$. Es konnte für beide FW- Gruppen eine Abnahme des Epithelschadens von 0,5 Pixeleinheiten (SD: 1,03) in Gruppe 1, $p \leq 0,012$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und 0,83 Pixeleinheiten (SD: 1,69) in Gruppe 2, $p \leq 0,017$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, ermittelt werden. Bei der Gruppe 3 dieser Studie, die mit isotoner Salzlösung inkubiert wurde, wurde dagegen eine Zunahme des Epithel-

schadens um 0,83 Pixeleinheiten (SD: 1,09) ermittelt. Die Unterschiede zwischen der Gruppe 1 und 2 waren nicht statistisch signifikant [29]. Ebenso signifikant besser war der Effekt beider HAF- Gruppen bezüglich der Opakizität der Kornea im Vergleich mit isotoner Salzlösung. Eine klinische Anwendung erfolgt bis jetzt nicht.

Im Fruchtwasser wurden unter anderem Inhaltsstoffe gefunden wie im Serum, z.B. Glukose, TGF- β , Fibronectin, Proteine und Vitamin A und so stellt sich die Frage, ob sie in ihrer Konzentration eine ebensolche Wirkung haben wie im Serum. Glukose ist, wie schon beschrieben, der Hauptenergielieferant für ATP- abhängige Zellvorgänge wie Zellwachstum und Zellteilung. Fibronectin ist ein Glykoprotein, das unter anderem in Basalmembranen vorkommt und eine wichtige Funktion bei der Migration und Zell- Adhäsion einnimmt, da es in der extrazellulären Matrix eingelagert ist und als Adhäsionsmolekül fungiert. EGF wirkt als Protein in der Signalkette bei der Einleitung der Mitose verschiedenster Zellen mit und ist somit für die Proliferation unabdingbar. Die Funktion von Vitamin A wird bisher vor allem bei der Genexpression und in der Stabilisierung von Zellmembranen gesehen. Vitamin A (All-trans-Retinolsäure und die 9-cis-Retinolsäure) bindet an Retinolsäurerezeptoren und Retinoid-X-Rezeptoren und bildet dadurch Heterodimere. Diese Heterodimere wiederum binden an Regulationsregionen der Chromosomen. Die Bindung dieses Heterodimer- Komplexes ermöglicht die Regulation der Gentranskription und beeinflusst so die Synthese verschiedener Proteine und der damit verbundenen Zelldifferenzierung [46]. Wachstum und Ausbreitung von Zellen ist nur bei intakter und stabiler Zellmembran möglich. Dabei darf natürlich nicht vergessen werden, dass es sich hierbei um ein Zusammenspiel diverser Faktoren handelt und eine eindeutige Zuordnung der Ergebnisse zu einem Faktor nicht möglich ist. Dies liegt an der oftmals nicht vollständig aufgedeckten isolierten Wirkung einzelner Stoffe, wie beispielsweise EGF, TGF- β und Vitamin A sowie in ihrem nicht völlig geklärten Zusammenspiel untereinander. Da humanes Fruchtwasser bisher noch nicht im Vergleich zu den schon klinisch eingesetzten Serum- AT an humanen Korneaepithelzellen untersucht wurde, entstand die Idee humanes Fruchtwasser an humanen Korneaepithelzellen in einem in- vitro Modell zu testen. Hierbei sollten nun ausgesuchte Inhaltsstoffe, die Proliferations- und Migrationseigenschaften sowie das Zelltodverhalten vergleichend untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Serumgewinnung

150 ml Vollblut wurde, nach Aufklärung und Einwilligung, von 10 gesunden Freiwilligen im Alter von 22 bis 41 Jahren, nach sorgfältiger Hautdesinfektion mit Cutasept durch Venenpunktion der Vena Cubiti, in Sarstedt Monovetten 9 ml gewonnen. Nach Ablauf der spontanen Gerinnung über zwei Stunden bei Raumtemperatur, wurden die Proben bei 1812g für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend das Serum unter sterilen Bedingungen aliquotiert. Die Aliquots lagerten bis zur Verwendung bei -70°C in 1,5 ml Micro-Tubes. Alle verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte sind in den Tabellen 6.12 - 6.14 aufgeführt.

2.2 Fruchtwasserproben

Die Fruchtwasserproben wurden durch das Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um den Überstand von Proben, die routinemäßig zur humangenetischen Untersuchung eingesandt wurden. Der nicht mehr benötigte Rest, der sonst verworfen worden wäre, von 20 Proben, im Mittel 7 ml, wurde anonymisiert und zufällig ausgewählt für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die Aufbewahrung der Fruchtwasser- Aliquots erfolgte bei -36°C. Zur jeweiligen Probe wurde durch das Institut für Humangenetik lediglich das Alter der Schwangeren (im Mittel 38 ± 2 Jahre) sowie die Schwangerschaftswoche ($15 \pm 1,3$ Wochen) bei Entnahme mitgeteilt.

2.3 Zellkulturmodell

Im Zellkulturmodell wurde die humane Hornhautepithelzelllinie RCB1384 (Riken Cell Bank, Ibaraki; Japan) verwendet. Diese Zelllinie wurde durch Immortalisierung von primären Zellen mittels SV- 40- Adenovirus- Vektor gewonnen und zeigt weitgehend die Eigenschaften einer normalen Korneaepithelzelle [2]. An den RCB1384- Zellen wurde der Effekt von Serum und Fruchtwasser auf die Proliferation, Migration und Zytotoxizität in Dosis- und Zeitwirkungsexperimenten untersucht. Die Zellen wurden bei

5 % CO₂, 95 % O₂ und 37°C mit 1:1 Ham's F12 und MEM unter Zusatz von 25 nM HEPES Puffer, 5 % fötalem Rinderserum, 1,12 % Antibiotikum/ Antimykotikum, 0,01 % EGF, 0,22 % Insulin und 0,01 % Cholera toxin kultiviert [2], [47]. Das Kulturmedium wurde alle 48 bis 72 Stunden ausgetauscht und die Zellen bei Konfluenz mittels 0,5 % Trypsin- EDTA im Verhältnis 1:3 passagiert [28].

2.4 Verwendete Medien

2.4.1 Nährmedium Shem X

Shem X wurde als Zellkulturnährmedium verwendet, da es eine für diese Zellen optimierte Zusammensetzung aufweist [47]. Es besteht aus Ham's F12 Medium und Minimal essential Medium (MEM) im Verhältnis 1 : 1 mit 25 ml HEPES. Desweiteren enthält es hitzeinaktiviertes 5% Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 µg/ml, Insulin 5 µg/ml, Cholera toxin 0,1µg/ml, sowie Epithelial growth factor (EGF) 10 ng/ml. Das Shem X Medium wurde nach Herstellung steril filtriert. Nach der Filtration ist das Medium bei 4°C einen Monat lang haltbar.

2.4.2 Minimalmedium

Minimalmedium wurde zur Vorbereitung der Zellen vor der Inkubation mit den Testsubstanzen verwendet. Es besteht aus Ham's F12 Medium und MEM zu gleichen Teilen sowie aus Bovine Serum Albumin (BSA) und 1 Prozent Penicillin/ Streptomycin.

2.4.3 Hydroxyurea- Medium

Es besteht aus dem Nährmedium Shem X, dem 200 µM Hydroxyurea hinzugefügt wurde.

2.5 Proliferation: ATP- Assay

Zuerst erfolgte die Gewinnung von Zellen aus einer bis zur Konfluenz bewachsenen Zellkulturflasche der Größe 250 ml. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und das PBS danach ebenfalls abgesaugt. Nun erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Trypsin- EDTA um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Die im Medium befindlichen Zellen wurden in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig abgesaugt. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde in 1 ml Shem X gelöst und die Zellen wurden gezählt. Für die Zellzählung wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypan blau in einem 1,5

ml Reagenzröhrchen gemischt und danach in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Mit der Zellzahl konnte das zur Aussaat benötigte Volumen der Zellsuspension berechnet werden. Danach erfolgte die Aussaat von 3000 Zellen in 200 μ l Shem X in 96- Loch Zellkulturplatten. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von 30 %. Dann folgte eine Inkubation mit Minimalmedium für 24h. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Serum und Fruchtwasser in den Verdünnungen 100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 0 % jeweils über 6, 24 und 48h inkubiert. Jede Probe wurde als Triplikat aufgetragen. Die Verdünnungen wurden mit Balanced Salt Solution (BSS) hergestellt und die 0 % ige Konzentration bestand aus reiner BSS. Als Negativ- Kontrolle wurde einprozentiges Benzalkoniumchlorid und für die Positiv- Kontrolle das Medium Shem X verwendet. An den jeweiligen Endpunkten erfolgte der ATP- Assay mit ATPLiteTM- M. Die Testsubstanzen wurden abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und jede Vertiefung mit 100 μ l PBS angefüllt. Dazu wurde pro Vertiefung 50 μ l Mammalian Cell Lysis Solution hinzu gegeben. Es folgte eine 20- minütige Inkubation auf einem Orbital- Rüttler bei 200 Umdrehungen pro Minute. Danach lagerten die Zellkulturplatten bei -70°C bis zur ATP- Messung. Dies diente der Gleichbehandlung aller Kulturplatten. Zur ATP- Messung wurden die Platten langsam aufgetaut und 50 μ l des in der Vertiefung befindlichen Zellextraktes wurden in weiße unbehandelte 96-Loch Platten pipettiert. Dazu wurde 25 μ l Luciferin-Luciferase Substrat Lösung zugegeben und 5 min bei 200 Umdrehungen pro Minute auf dem Rüttler inkubiert, anschließend folgte eine weitere 10- minütige Inkubation auf dem Rüttler, nun aber lichtgeschützt. Es folgte die Messung der Lumineszenz mit dem ELISA Messgerät Infinite F200. Die relative ATP-Biolumineszenz entspricht dem prozentualen Zellwachstum, da sie direkt proportional zur Zellzahl ist und wird mit folgender Formel berechnet [27], [28].

$$\frac{T_{\text{Test}} - MI}{MO - MI} \times 100 = \text{ATP- Biolumineszenz in Prozent}$$

“MO” ist der Mittelwert der ATP- Biolumineszenz der Posotiv- Kontrolle, “MI” der Mittelwert der Negativ- Kontrolle und “Test” ist die ATP- Biolumineszenz der Zellkulturen mit den Testsubstanzen. Pro Proband wurde ein Mittelwert aus dem Triplikat ermittelt und aus diesen Mittelwerten wurde wiederum ein Mittelwert für die Substanz bei der jeweiligen Konzentration berechnet.

2.6 Migration: Kolonie Dispersions- Assay

Die Migration der Epithelzellen wurde mittels Kolonie Dispersions- Assay quantifiziert. Dazu erfolgte zuerst die Beschichtung der 6- Loch- Kulturplatten mit Kollagen Typ VII vom Rattenschwanz. Das Kollagen wurde als 0,01 % ige Lösung mit 0,1 M Essigsäure

hergestellt und in jedes Loch 730 μl Kollagenlösung eingefüllt. Zur gleichmäßigen Verteilung des Kollagens inkubierten die Platten bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % O_2 über 4h. Danach trockneten sie über Nacht unter dem Gebläse der Werkbank. Es folgte die Sterilisation unter UV- Licht für 6h. In die so beschichteten 6- Loch-Platten wurden pro Loch 3- 4 sterile Silikonzyylinder platziert. In diese Zylinder wurden 20000 Zellen in 200 μl Shem X gesät und bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. War die Konfluenz erreicht, wurde die Proliferation der Zellen durch eine 24- stündige Inkubation mit 150 μl Hydroxyurea- Medium gehemmt. Nach einmaligem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation über 24 h mit Minimalmedium. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Silikonzyylinder vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette entfernt und jedes Plattenloch dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte der Probenauftrag. Die Zellen wurden mit 10 Serum- und 10 FW- Proben in 100, 50 und 25 prozentiger Konzentration für 24, 48 und 96 h inkubiert. Die Verdünnungen wurden mit BSS hergestellt. Bei Inkubationsende wurde 90 % iges Methanol für 10 min zur Fixierung der Zellkulturrasen aufgetragen und anschließend mit Hämatoxylin über 30 min gefärbt. Das überschüssige Hämatoxylin wurde mit PBS in mehreren Waschvorgängen entfernt. Zur Flächenbestimmung der Zellrasen wurden die einzelnen Löcher aus einer definierten Entfernung von 16,5 cm mit der Minolta Dimage F200 Kamera, Japan, bei stärkstem Zoom, Funktion "Makro" und ohne Blitz in dem Menü "Auto" fotografiert. Pro Proband wurde ein Mittelwert aus dem Triplikat der Zellrasenfläche ermittelt und aus diesen Mittelwerten wurde wiederum ein Mittelwert für die Substanz bei der jeweiligen Konzentration berechnet. Die Schwankungsbreite wurde als "Standard Error of the Mean" (SEM) dargestellt.

2.7 Zelltod: Apoptose- Assay

Als Apoptose Assay wurde der Cell Death Detection ELISA *PLUS* Version April 2006 der Firma Roche verwendet. Dieser Assay wurde an einer humanen Lymphomzelllinie U937(ATCC CRL 1593) und dem Topoisomerase I- Inhibitor Camptothecin entwickelt und erprobt. Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurde in Vorversuchen die für die Zellaussaat nötige Zellzahl ermittelt. Anhand der gemessenen Absorptionswerte zeigte sich, dass die Versuche mit der Aussaat von 5000 Zellen pro Loch und einer 48 h Inkubation vor dem eigentlichen Probenauftrag optimal durchzuführen sind. Die Testsubstanzen wurden in unverdünnter, in 50 % und 6,25 % iger Konzentration untersucht. Dieser Assay bietet gleichzeitig die Möglichkeit Material für eine LDH- Messung zu gewinnen, da LDH als Nekroseindikator genutzt werden kann. Die Zellgewinnung erfolgte wie bei dem ATP- Assay, ebenso die Zellzählung. Danach wurden 5000 Zellen pro Well in 96 iger Loch Platten ausgesät. Nach der Aussaat und Inkubation über 48h bei 37°C und 5 % CO_2 mit Shem X wurde das Medium vorsichtig abgesaugt.

Anschließend wurde 150 μl Probenmaterial der verschiedenen Konzentrationen in die einzelnen Vertiefungen pipettiert. Die Zellen, die für die Negativkontrolle vorgesehen waren, wurden mit Shem X versetzt. Nach der Inkubation mit dem Probenmaterial erfolgte die sorgsame Entfernung des Überstands über dem Zellrasen. Dieser wurde in 1,5 ml Eppendorfröhrchen pipettiert und bei 2000 Umdrehungen pro Minute 2 min mit der Eppendorfsentrifuge zentrifugiert. Danach erfolgte die Übertragung des Überstands in neue 1,5 ml Eppendorfröhrchen und die Aufbewahrung bei -35°C bis zur LDH- Messung. Die zentrifugierten Zellen wurden durch Inkubation in 200 μl Lysis Puffer über 30 min bei Zimmertemperatur resuspendiert und lysiert. Nach Zentrifugation des Lysats bei 200g für 10 min wurden 20 μl vom Überstand vorsichtig in die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte transferiert. In jede Vertiefung erfolgte die Gabe von 80 μl Immuno-reagenz (aus ELISA Kit) mit anschließender Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte bei Zimmertemperatur auf einem Orbital- Rüttler bei 250 Umdrehungen pro Minute für zwei Stunden. Nach dieser Inkubation folgten Waschgänge mit je 250 μl Inkubationspuffer durch den automatischen Wascher. Zu jedem Loch wurden danach 100 μl ABTS- Lösung (aus ELISA Kit) hinzu gegeben und für 15 min bei 200 Umdrehungen pro Minute inkubiert, bis eine starke Farbentwicklung erkennbar war. Diese Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 μl ABTS Stop Lösung (aus ELISA Kit) gestoppt. Die Absorption wurde bei 405 nm gegen ABTS Lösung und ABTS Stop Lösung als Leerwert gemessen. Als Referenzwellenlänge wurde die Wellenlänge von 490 nm verwendet. Zur Berechnung der Anreicherung wurde der Mittelwert der Absorption der Probenduplikate gebildet. Danach wurde der Hintergrundwert (Inkubationspuffer + ABTS Stop Lösung) von jedem dieser Mittelwerte subtrahiert und die Anreicherung (Anreicherung ist die Extinktionsabnahme durch die im Zytoplasma gelösten Mono- und Oligonukleosomen) im Zytoplasma nach folgender Formel analysiert.

$$\frac{mU_{\text{der Proben(sterbende/tote Zellen)}}}{mU_{\text{der Negativkontrollprobe}}} = \text{Anreicherungs-faktor}$$

“mU” = Absorption (10^{-3})

2.7.1 LDH- Messung – Nekrose

Für die LDH- Messung wurde der während des Apoptose- Assays gewonnene Zellkulturüberstand, der bei -35°C lagerte, verwendet. Dieser besteht aus dem Probenmaterial, mit dem inkubiert wurde sowie aus toten, abgelösten HCE- Zellen. Damit es nicht zu einer Verfälschung der Werte durch LDH kam, das von vornerein im Serum und im Fruchtwasser vorhanden war, wurde außerdem in allen nativen Serum- und Fruchtwasserproben der LDH- Gehalt gemessen. Die LDH- Messung erfolgte mit dem vollautomatischen Photometer Aeroset. Die Messung des LDH erfolgt indirekt am Verbrauch

eines geeigneten chromogenen Substrates, in diesem Fall Nicotinamidadenindinukleotid (NADH). Dafür wird die von LDH katalysierte, Reaktion von Pyruvat + NADH + H^+ zu Lactat und NAD^+ genutzt. Der NADH- Verbrauch wird aus der Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen und entspricht der Konzentration an LDH. Die Einheit ist $U/l = \text{Volumenaktivität } (\mu\text{mol}(\text{Substrat})/(\text{min} \cdot l))$. Die Werte der Nativproben wurden dann nach einzelner Probenzugehörigkeit als Hintergrundwert von den LDH- Konzentration aus den Überständen subtrahiert.

2.8 Inhaltsstoffbestimmung in Serum und Fruchtwasser

2.8.1 EGF, TGF- β 1, Fibronectin

EGF

Die EGF- Bestimmung wurde mit dem Quantikine Human EGF ELISA der Firma R und D Systems durchgeführt. Dafür wurden zuerst die einzelnen Reagenzien nach Anleitung präpariert und die Proben ebenso vorbereitet. FW wurde dabei wie Urin behandelt, so dass die FW- Proben bei der Probenvorbereitung 200- fach mit Kalibrator- Diluent RD5E und die Serumproben mit Kalibrator- Diluent RD6N 20 fach verdünnt wurden.

Die Durchführung begann für die Serumproben mit der Auftragung von Assay- Diluent RD1-6 (ELISA Kit) in jede benötigte Vertiefung der 96- Loch Mikrotiterplatte. Danach konnte mit der Probenauftragung im Duplikat begonnen werden. Bei der Messung von FW- Proben wurde gleich mit dem Schritt der Probenauftragung im Duplikat, inklusive Standard und Negativkontrolle, begonnen. Der weitere Ablauf war für beide Substanzen gleich. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Zimmertemperatur. Danach wurde mit einem automatischem Waschgerät der Firma Tecan die Platte dreimal mit 400 μ l Waschpuffer gewaschen. Nun wurde pro Loch 200 μ l EGF- Konjugat (ELISA Kit) hinzu gegeben und die Serumproben zwei Stunden, die FW- Proben eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde obiger Waschvorgang wiederholt. Dann erfolgte pro Loch die Zugabe von 200 μ l Substratlösung (ELISA Kit) für 20 min. Während dieser Inkubation musste die Platte vor Licht geschützt werden. Durch Hinzufügen von 50 μ l Stop- Lösung (ELISA Kit) wurde die Reaktion gestoppt, was an dem Farbumschlag von blau zu gelb ersichtlich war. Die Messung der Absorption mit dem Tecan ELISA Messgerät geschah innerhalb einer halben Stunde bei einer Wellenlänge von 450 nm. Als Referenzwellenlänge wurden 540 nm gewählt.

Zur Berechnung der Konzentration an EGF war die Berechnung des Mittels der beiden Werte pro Probe notwendig, von dem die Werte der Leewertkontrolle subtrahiert wurden. Nun konnte anhand der Standardkurve die Konzentration abgelesen werden, wobei für jedes Verdünnungsmittel eine eigene Standardkurve gezeichnet werden muss-

te. Der abgelesene Wert wurde dann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die korrekte Konzentration in der Probe zu erhalten.

TGF- β 1

Die TGF- β 1- Analyse wurde mittels Quantikine Human TGF- β 1 ELISA durchgeführt. Damit TGF- β 1 im Serum und im Fruchtwasser überhaupt messbar war, mussten die Proben vorher aktiviert werden. Die Probenaktivierung erfolgte nach Anleitung mit 1 mol/l HCl in 10 min Inkubation und der anschließenden Neutralisierung mit 1,2 mol/l NaOH/ 0,5 mol/l HEPES. Bei den Fruchtwasserproben erfolgte die Durchführung des Assays sofort, die Serumproben wurden noch mit Kalibrator- Diluent RD5-26 20- fach verdünnt. Der erste Schritt war die Zugabe von 50 μ l Assay- Diluent in jedes benötigte Loch der Mikrotiterplatte. Dabei war für die Serumproben das Assay- Diluent RD1-73 und für FW das Diluent RD1-21 (ELISA Kit) zu benutzen. Der dann folgende Ablauf des Assays war für die Serum- und FW- Proben gleich. Es wurden 50 μ l der entsprechenden Testsubstanzen, der Standards und der Negativkontrolle, alles im Duplikat, aufgetragen und bei Raumtemperatur über zwei Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte ein vierfacher Waschvorgang mit 400 μ l Waschlösung (ELISA Kit) durch das automatische Waschgerät. Am Ende des Waschvorgangs wurde der Waschlösung abgesaugt und die verbliebene Restflüssigkeit vorsichtig ausgeklopft. Der nächste Schritt war die Zugabe von 100 μ l TGF- β 1 Konjugat (ELISA Kit) in jede Vertiefung mit anschließender Inkubationszeit von zwei Stunden, ebenfalls bei Raumtemperatur. Danach folgte erneut obiger Waschvorgang. Darauf wurden 100 μ l der Substratlösung (ELISA Kit) in jedes Loch gegeben und über 30 min lichtgeschützt inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung (ELISA Kit) wurde die Reaktion gestoppt, sichtbar durch den Farbumschlag von blau nach gelb. Anschließend, innerhalb von 30 min, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem ELISA Messgerät gemessen. Die Referenzmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 540nm.

Zur Berechnung der Konzentration von TGF- β 1 wurde das Mittel der beiden Werte pro Probe berechnet und die Negativkontrollwerte subtrahiert. Nun konnte anhand der Standardkurve die Konzentration abgelesen werden, wobei für jedes Verdünnungsmittel eine eigene Standardkurve gezeichnet wurde. Durch die Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor ergab sich dann die korrekte Konzentration der jeweiligen Probe.

Fibronektin

Der Fibronektin Gehalt der Serum- und FW- Proben wurde mit dem human Fibronektin ELISA BMS2028 der Firma Bender MedSystems nach den Herstellervorschriften bestimmt.

Zuerst wurde ein zweimaliger Waschvorgang mit 300 μ l Waschlösung (ELISA Kit) durch

das automatische Waschgerät vorgenommen, bei dessen Ende der Waschpuffer abgesaugt wurde. Nun wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte für die Standardreihe und Leerwertereihe 100 μl Assay- Puffer (ELISA Kit) gegeben und in die Löcher für die Proben jeweils 50 μl . Die Standards, Leerwerte und Proben wurden als Duplikate aufgetragen. Daraufhin konnte nun 50 μl frisch präpariertes Biotin- Konjugat (ELISA Kit) in jedes Loch gegeben werden. Anschließend folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf einem Orbital- Rüttler bei 100 rpm. Nach der Inkubation schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang wie zu Beginn an und es wurde 100 μl Streptavidin- HRP (ELISA Kit) in alle Vertiefungen hinzugegeben. Danach wurde wieder bei Zimmertemperatur inkubiert, diesmal für eine Stunde, ebenfalls bei 100 rpm auf dem Rüttler. Ein erneuter dreimaliger Waschgang wie am Anfang schloss sich an. In dieser Zeit wurde die TMB Substrat Lösung angesetzt und nach dem Waschen davon 100 μl in jedes Loch pipettiert. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubation über 20 min bei 100 Umdrehungen pro Minute auf dem Rüttler bei Raumtemperatur. Nun erfolgte mit der Zugabe von 100 μl Stopplösung die Beendigung dieser Reaktion, ersichtlich an dem Farbumschlag nach gelb. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt. Als Referenz diente die Wellenlänge von 620 nm.

Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Standardkurve gezeichnet. Zur Berechnung der Konzentration von Fibronectin wurden die beiden Werte pro Probe gemittelt und die Negativkontrollwerte subtrahiert. Nun konnte anhand der Standardkurve die Konzentration abgelesen werden. Die korrekte Konzentration ergab sich durch Multiplikation der abgelesenen Werte mit dem Verdünnungsfaktor.

2.8.2 Vitamine

Die Bestimmung von Vitamin A und Vitamin E im Serum und im FW erfolgte durch das Labor des Instituts für Klinische Chemie am UK- SH Lübeck mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Die Proben wurden vorbereitet, indem eine Probenmenge von je 260 μl in 1,5 ml Mikrotubes der Firma Sarstedt pipettiert wurden.

Zum Prinzip der HPLC: Die Auftrennung der Stoffe gelingt, da sie sich auf Grund unterschiedlicher Dichte und Polarität in zwei Phasen unterschiedlich verteilen. Die mobile Phase bewegt sich an der stationären Phase vorbei und nimmt die gelösten Stoffe verschieden schnell mit. Bei Austritt aus der Säule können die Stoffe dann mit geeigneten Detektoren nachgewiesen werden. Vitamin A/E wird zuerst mit ethanolisch-wässriger Kalilauge verseift und der freigesetzte Vitamin A/ E- Alkohol mit n- Hexan extrahiert und der Extrakt eingeeengt. Der Rückstand wird dann in Methanol gelöst und stellt damit die mobile Phase dar. Die stationäre Phase ist eine RP-C₁₈- Säule, wobei das RP für Reversed-Phase steht. Normalerweise ist die Säulenoberfläche po-

lar und das Eluent eher apolar. Das bedeutet, die Oberfläche der Chromatographie-Säule ist mit langen Kohlenstoffketten (C_{18}) überzogen und ist damit apolar. Bei einer RP-C- Säule ist es umgekehrt: als mobile Phase werden polare Flüssigkeiten benutzt, die Phasen sind also umgedreht (reversed). Als Detektor wird ein UV- Detektor verwendet, der die Absorptionsverringerng durch den lichtabsorbierenden Stoff (Vitamin A/ E) misst. Der Wert der Absorptionsverringerng wird computergesteuert als Kurve (Chromatogramm) aufgezeichnet und anschließend die Fläche des Analyt- Peaks im Chromatogramm berechnet. Anhand der Standardkurve erfolgt vollautomatisch die Konzentrationsbestimmung der Analyte.

2.8.3 Glukose, Albumin, Gesamtprotein

Die Bestimmung von Glukose, Albumin und Gesamtprotein im Serum und im FW erfolgte durch das Labor des Instituts für Klinische Chemie am UK- SH Lübeck nach Vorbereitung der Proben. Diese wurden dann per Photometrie durch das vollautomatische Photometer Aeroset analysiert. Die Ergebnisse wurden als Ausdruck ausgegeben. Das Prinzip der Glukosemessung ist folgendermaßen: D-Glukose wird durch das Enzym Hexokinase mit Adenosintriphosphat zu D-Glukose-6-Phosphat unter Adenosindiphosphat- Bildung phosphoryliert. Die D-Glukose-6-Phosphat wird dann durch das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und $NADP^+$ zu D-Glukonat-6-Phosphat oxidiert. Das entstehende NADPH wird bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. $NADPH + H^+$ ist der D-Glukosemenge äquimolar und kann dadurch zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von D-Glukose genutzt werden.

Messprinzip der Proteine nach Bradford: Als Reagenz wird Coomassie Brillant Blue verwendet, das zu der Substratlösung hinzugegeben wird und an die Proteine bindet. So entsteht ein Farbstoff- Protein- Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm hat. Bei dieser Wellenlänge wird dann die Absorption gemessen. Freier Farbstoff Coomassie Brillant Blue hat dagegen sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 470 nm, so dass es bei der Messung bei 595 nm nicht mit erfasst wird. Zur Kalibrierung werden Standardproteine, bezogen auf das zu untersuchende Protein, genutzt, da andernfalls in einem Proteingemisch keine genaue Proteinbestimmung möglich ist.

2.8.4 Messung chemischer Eigenschaften

Osmolarität

Die Osmolarität der verwendeten Lösungen (Medien, Serum- und FW- Proben) wurde mit dem Osmometer bestimmt. Das Gerät misst die Osmolarität in einer Probenmenge von 10 μ l im Bereich von 0 bis 2000 mOsm/l. Die Probenmenge wurde in Ep-

pendorfgefäße blasenfrei pipettiert und die einzelnen Eppendorfgefäße wurden in den Messteller eingehängt. Das Prinzip der Osmolaritätsmessung beruht darauf, dass der osmotische Wert den Gefrier- und Siedepunkt einer Lösung beeinflusst. Dadurch ist eine indirekte Messung über die Bestimmung der Gefrierpunktniedrigung möglich. Zuvor muss mittels Standardlösung kalibriert werden. Dazu wird die Probe im Kühlblock des Osmometers gefroren und die Kristallisationstemperatur gemessen, da diese darüber Auskunft gibt um wieviel Grad der Gefrierpunkt gesenkt wurde. Die Messung erfolgte vollautomatisiert und die Ergebnisse wurden als Papierausdruck ausgegeben.

pH- Wert

Der pH- Wert aller genutzten Lösungen (Medien, Serum- und FW- Proben) wurde bei Zimmertemperatur mittels pH- Meter gemessen. Das pH- Meter hat einen Messbereich von 0 pH bis 14 pH. Bevor der pH- Wert der Substanzen gemessen wurde, erfolgte eine Eichung mit Standardlösung bei einem pH von 4,01 und bei einem pH von 7,41. Die Messelektrode wurde zur Messung in die einzelnen Proben gehalten und danach mit destilliertem Wasser kurz gespült. Der pH- Wert konnte dann an einem digitalen Display abgelesen werden.

2.9 Datenauswertung und statistische Methoden

Die Datenauswertung wurde mit Graph Pad Prism 4.0 für Windows XP (Version: Édition familiale) durchgeführt. Die Überprüfung der Ergebnisse auf Standardnormalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov Smirnov Test. Der zweiseitige t- Test für unverbundene Stichproben wurde für die Auswertung der Proliferation, Migration und der Zelltod- Untersuchung zur Signifikanzprüfung verwendet. Als statistisch signifikant gilt $p \leq 0,05$. Die Untersuchung auf Korrelation zwischen den Inhaltsstoffen und der Proliferation sowie der Migration erfolgte mit dem Test nach Pearson. In diesem Zusammenhang wurden die Ergebnisse auf das Vorliegen einer Linearen Regression hin analysiert. Die Bestimmung der Zellkoloniefäche bei den Versuchen der Migration wurde mit dem Programm Matlab R2007b und der “image processing toolbox” als Bildanalyse Software, modifiziert von Jens Keiner, ermittelt, so dass über automatische Bildsegmentierung die Zellkoloniefäche in Pixel ausgemessen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Eigenschaften

3.1.1 Osmolarität

Die Osmolarität des optimalen Nährmediums Shem X betrug 296 mOsm/l, die des Minimalmediums 298 mOsm/l und die des Hydroxyurea- Mediums 300 mOsm/l. In unverdünntem Zustand hatte das Serum eine Osmolarität von 299,5 mOsm/l (Standardfehler (SEM) 1,6 mOsm/l) Bei den Fruchtwasserproben wurde die Osmolarität mit 290,5 mOsm/l gemessen (SEM = 3,42 mOsm/l).

3.1.2 pH- Wert

Der pH- Wert der Serumproben lag bei 7,43 mit einem Standardfehler von 0,01 und bei den Fruchtwasserproben wurde ein pH von 7,57 mit einem SEM von 0,03 gemessen. Die verwendeten Nährmedien hatten einen pH von 7,4.

3.2 Inhaltsstoffbestimmung

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten in unverdünntem Probenmaterial. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Bei der Schwankungsbreite handelt es sich um den Standardfehler des Mittelwertes. Die Messergebnisse sind standardnormalverteilt und die Unterschiede zwischen Serum und FW sind für jeden Parameter signifikant ($P \leq 0,0001$).

	EGF ng/ml	TGF β 1 ng/ml	Fibronektin ng/ml	Vit. A μ mol/l
Serum	0,75 $\pm$ 0,05	27,09 $\pm$ 4,43	535,4 $\pm$ 85,6	2,6 $\pm$ 0,54
Fruchtwasser	<0,0007	0,12 $\pm$ 0,05	60,42 $\pm$ 4,51	0,16 $\pm$ 0,04

	Vit. E μ mol/l	Glukose mmol/l	Totalprotein g/l	Albumin g/l
Serum	28,94 $\pm$ 5,41	5,15 $\pm$ 0,33	71,74 $\pm$ 0,79	43,39 $\pm$ 1,26
Fruchtwasser	< Messbereich	2,88 $\pm$ 0,16	3,94 $\pm$ 0,27	< 4

Tabelle 3.1: Biochemische Eigenschaften von unbehandeltem Serum und Fruchtwasser

3.3 Proliferation: ATP- Assay

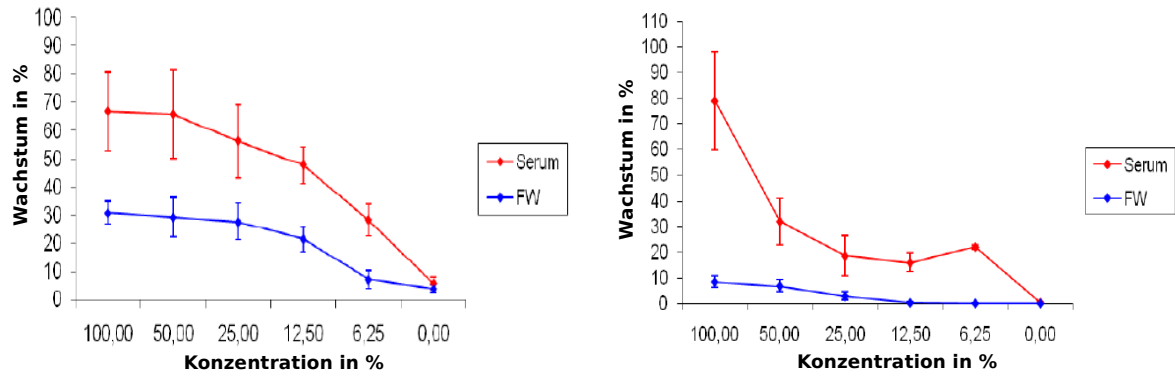
3.3.1 Dosis- Wirkungs- Untersuchung

Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen die Dosis- Wirkungs- Kurven der ATP- Assays bei 6, 24 und 48 h Inkubationszeit. Auf der X- Achse sind die verschiedenen Konzentrationen der Serum- und FW- Proben aufgetragen, auf der Y- Achse ist das relative Zellwachstum dargestellt. Die Schwankungsbreite ist als SEM abgebildet. Als 100 Prozent relatives Zellwachstum wurde das Wachstum der Zellen bei Inkubation mit dem optimalen Nährmedium Shem X definiert [37], [1].

Die Zellproliferation wurde am besten durch Serum unterstützt, während FW zu wesentlich geringerer Zell- Proliferation führte. Nach der Inkubation über 6 h mit unverdünntem Serum wiesen die Zellen ein maximales Wachstum von $66,82 \pm 13,9$ % auf. Die nachfolgenden Konzentrationen von 50, 25 und 12,5 % zeigten eine gering abfallende proliferationsfördernde Wirkung, die Unterschiede zwischen diesen Konzentrationen waren nicht statistisch signifikant. Erst im Vergleich zu den Ergebnissen nach Inkubation mit 6,25 iger Serumlösung und 0 % iger Serumlösung (relatives Wachstum von 28,36 % (6,25 % Serumlösung) und 5,98 % (0 % Serumlösung)) wurde der Proliferationsunterschied signifikant ($p \leq 0,04$, Tabelle 6.1). Ein ähnliches Ergebnis wurde nach 48- stündiger Inkubation mit Serum beobachtet, aber bei insgesamt höherer Zellproliferation (Tabelle 6.3).

Bei der Inkubation mit FW ist ebenfalls erkennbar, dass mit zunehmender Verdünnung der FW- Proben die Zellproliferation abnimmt. Dies ist bei allen drei Inkubationszeiten deutlich. Im Vergleich zu den Serum- Proben weisen die Zellen unter Inkubation mit FW jedoch generell eine wesentlich geringere Proliferation auf. Nach der 6- stündigen Inkubation wurde bei unverdünnten Proben ein relatives Wachstum von $30,92 \pm 3,99$ % als Maximum gemessen, während es nach der 24- stündigen Inkubation nur noch $8,42 \pm 2,16$ % und nach 48 h $7,29 \pm 2,51$ % waren. In den drei Inkubationszeiten sind die Unterschiede der Proliferationsförderung von 100 und 50- prozentiger Konzentration zu 6,25 und 0 prozentiger Konzentration statistisch signifikant (Tabelle 6.1).

Im Vergleich der beiden Substanzen ist erkennbar, dass Serum in allen Konzentrationen zu besseren Proliferationsergebnissen führt und dass dieser Unterschied vor allem in den Konzentrationen von 100 und 50 % gegenüber den Konzentrationen der FW- Proben statistisch signifikant ist ($p \leq 0,03$), siehe Tabelle 6.1 und 6.3.



(a) Proliferation nach 6h Inkubation

(b) Proliferation nach 24h Inkubation

Abbildung 3.1: Darstellung der Ergebnisse des Proliferationsassays nach a) 6h und b) 24h. Auf der Y- Achse ist jeweils das Wachstum in Prozent und auf der X- Achse die Testsubstratkonzentration in Prozent aufgetragen. a) zeigt eine signifikant stärkere Proliferation der Zellen nach Inkubation mit Serum als nach Inkubation mit FW zwischen unverdünnten und 50% igen Konzentrationen ($p \leq 0,05$), wobei mit abnehmender Substratkonzentration auch das Wachstum geringer ausfällt. Nach Inkubation über 24 h zeigt sich im Diagramm b) ein anderer Verlauf zwischen abnehmender Substratkonzentration und abnehmendem Zellwachstum. Hier ist der größte Unterschied zwischen der unverdünnten und der 50% igen Konzentration beider Testsubstanzen ersichtlich. Wie auch schon in a) führt die Inkubation mit Serum zu signifikant stärkerer Proliferationsförderung ($p \leq 0,05$).

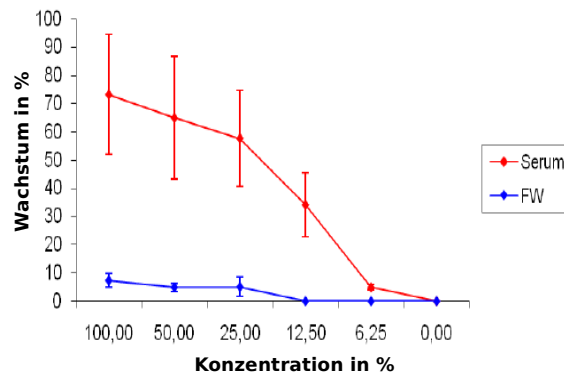


Abbildung 3.2: Ergebnisübersicht des Proliferationsassays nach Inkubation über 48h. Y- Achse: Wachstum in Prozent, X- Achse: Konzentration in Prozent. Mit abnehmender Konzentration beider Testsubstanzen nimmt die Proliferationsförderung ab. Serum zeigt, wie auch schon nach 6- stündiger Inkubation, eine signifikant stärkere Proliferationsförderung als FW.

3.3.2 Zeit- Wirkungs- Untersuchung

Die stärkere Potenz in der Proliferationsunterstützung von Serum im Vergleich zu FW wird besonders deutlich in der Analyse der Wachstumsergebnisse nach Inkubation mit den unverdünnten Testsubstanzen, siehe Abbildung 3.3 und Tabelle 6.1 - 6.3. Während es nach Inkubation mit Serum zu allen Untersuchungszeitpunkten zu einer deutlichen Proliferation kommt, 66,82 % (6 h), 79,15 % (24 h) und 73,19 % (48 h), führt die Inkubation mit unverdünntem FW bei zunehmender Inkubationszeit zu einer geringer werdenden Förderung des Zellwachstums. Nach Inkubation über 6 h wird ein Zellwachstum von 30,92 %, nach 24 h von 8,41 % und nach 48 h Inkubation ein relatives Wachstum von 7,29 % erreicht.

Werden die Ergebnisse nach Inkubation mit 50 % igem Serum und FW betrachtet, ist ersichtlich, dass Serum zu den untersuchten Zeiten die Proliferation der Zellen besser unterstützt als FW. Die Serumproben führen nach 6 und 48 h Inkubation zu ähnlichen Ergebnissen von $65,78 \pm 15,6$ % (6 h) und $64,93 \pm 21,73$ % (48 h) relativem Zellwachstum. Bei der Messung nach 24- stündiger Inkubation war ein relatives Wachstum von $32 \pm 9,09$ % messbar. Die Inkubation mit FW führte zu signifikant geringerem Zellwachstum. Nach 6- stündiger Inkubation war ein relatives Wachstum von $29,38 \pm 7,1$ %, nach 24 h von $6,85 \pm 2,4$ % und nur noch $4,85 \pm 1,46$ % nach 48 h ermittelbar.

Bei der Konzentration von 6,25 % ist festzustellen, dass mit zunehmender Inkubationsdauer die Proliferation unter Inkubation mit Serum zunimmt, während sie unter Inkubation mit FW abnimmt. Bei der Inkubation mit Serum ist eine anfängliche Proliferation von $28,36 \pm 5,52$ % nach 6 h und eine Proliferation nach 48h von $4,87 \pm 1,0$ % messbar. Für FW ergab die Untersuchung ein relatives Wachstum von $7,23 \pm 3,15$ % nach 6 h und einen Rückgang der Proliferationsförderung auf 0 Prozent nach 48- stündiger Inkubation. Die Proliferationsunterschiede zwischen Serum und FW sind signifikant mit $p \leq 0,001$.

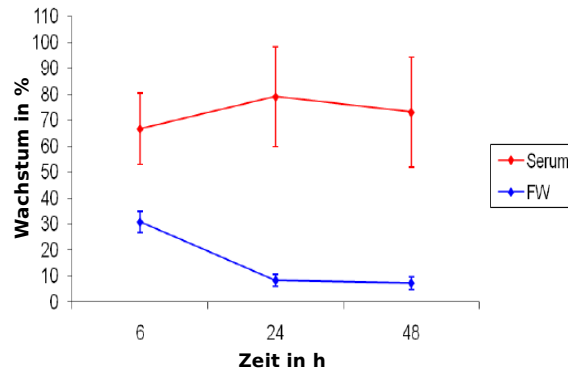


Abbildung 3.3: Übersicht über Proliferation nach Inkubation mit unverdünnten Testsubstanzen. Auf der Y- Achse ist das Wachstum in Prozent und auf der X- Achse die Zeit in Stunden aufgetragen. Hierbei wird ersichtlich, dass einerseits die Inkubation mit Serum zu signifikant stärkerer Zellproliferation führt als mit FW ($p \leq 0,032$) und andererseits, dass mit zunehmender Inkubationszeit die Proliferationsförderung unter Inkubation mit Serum zunimmt, während sie unter Inkubation mit FW abnimmt.

3.4 Migration: Kolonie- Dispersions- Assay

3.4.1 Dosis- und Zeit- Wirkungs- Untersuchung

Auf den Ergebnissen der Experimente zur Proliferation basierend erfolgte die Auswahl der Konzentrationen für die Durchführung der Migrationsversuche. Die Migration wurde für Serum in unverdünnter, 50 % iger und 25 % iger Konzentration untersucht. Die Untersuchung mit FW erfolgte, aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Materialmenge, nur in unverdünnter und 50 % iger Konzentration.

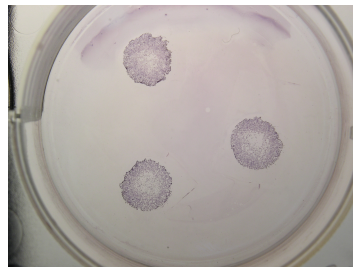


Abbildung 3.4: Zellrasen nach vollständiger Konfluenz, Nullpunktbestimmung.

Die Untersuchungen zur Migration ergaben eine signifikant höhere migrationsfördernde Potenz von Serum im Vergleich zu FW ($p \leq 0,05$).

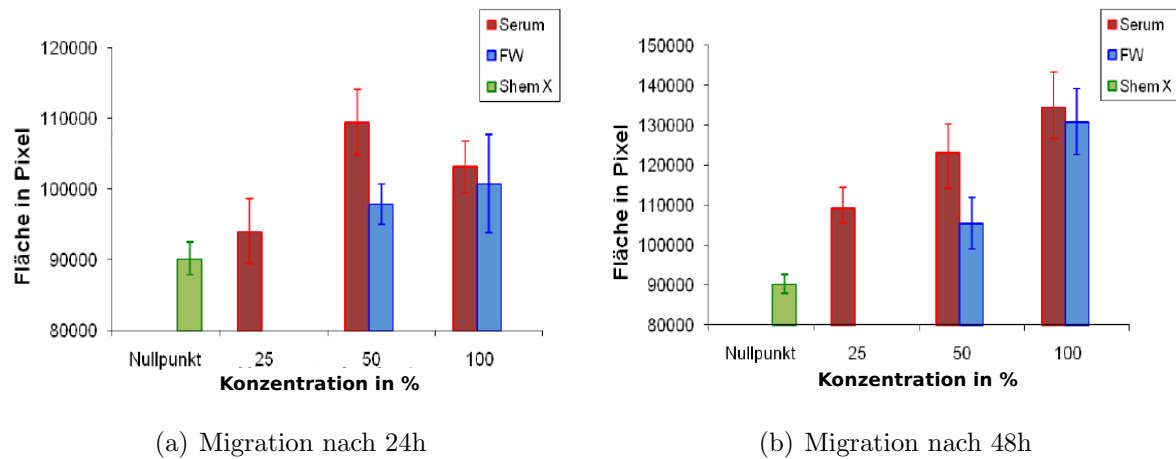


Abbildung 3.5: Migration nach 24 und 48 h. Auf der Y- Achse ist die ermittelte Zellrasenfläche in Pixel und auf der X- Achse sind die Konzentrationen der Serum- und FW- Proben aufgetragen. Die Schwankungsbreite ist als SEM dargestellt.

Nach 24- stündiger Inkubation mit 25 % igem Serum war die Migration der Zellen gering und zum Nullpunkt nicht signifikant unterschiedlich. Die Migration der Zellen nach Inkubation mit 50 % igem Serum war signifikant größer (Fläche: 109458 Pixel). Die Inkubation der Zellen mit unverdünnten Serumproben führte zu einer leicht geringeren Zellmigration (Fläche: 103178 Pixel) als die Inkubation mit 50 % iger Serumlösung. Der Unterschied zwischen diesen beiden Migrationsergebnissen ist allerdings statistisch nicht signifikant. Die Inkubation mit 50 % igem FW über 24 h zeigte eine signifikant geringere Förderung der Migration (Zellkoloniefäche: 97864 Pixel) im Vergleich zu Serum (109458 Pixel) ($p \leq 0,05$). Die Inkubation mit unverdünntem FW führte zu einer stärkeren Migration (100807 Pixel) als die Inkubation mit 50 % igem FW, blieb aber hinter der Migrationsförderung von unverdünntem Serum zurück.

Die untersuchten Konzentrationen der Testsubstanzen führten nach Inkubation über 48 h zu folgenden Ergebnissen: Nach Inkubation mit 25 % igem Serum war eine Migration bis zu einer Zellrasenfläche von 109283 Pixeln messbar. Erfolgte die Inkubation mit 50 % igen und unverdünnten Serumproben, so war ein Zuwachs der Zellrasenfläche auf 123070 Pixel (50 %) und 134476 Pixel (unverdünntes Serum) beobachtbar. Wurden die Zellen mit FW inkubiert, konnte eine Zellrasengröße von 105384 Pixel (50 %) und von 130903 Pixel (unverdünnt) ermittelt werden. Der Unterschied der Migrationsflächen zwischen mit Serum und FW inkubierten Zellen ist für beide Konzentrationen nach 48 h nicht statistisch signifikant.

Nach Inkubation mit Serum und FW über 96 h zeigten sich dann signifikante Unterschiede zwischen den Testsubstanzen. Bei den mit Serum inkubierten Zellen kam es, nach Inkubation mit unverdünnten Serumproben, zu einer Migration bis auf eine

Fläche von 190400 ± 7701 Pixeln. Die Inkubation mit Serum in 50 und 25 % iger Konzentration führte zur geringeren Migrationsförderung. Die mit unverdünntem FW inkubierten Zellen zeigten nach 96- stündiger Inkubation ebenfalls eine stärkere Migration als nach Inkubation mit 50 % igem FW, blieb dabei aber signifikant hinter dem Ergebnis nach Inkubation mit Serum zurück ($p \leq 0,0001$).

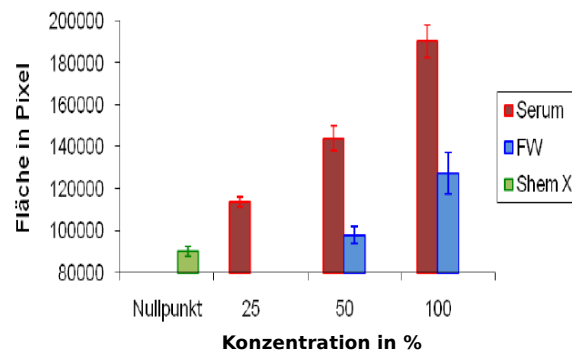


Abbildung 3.6: Migration nach 96h. Auf der X- Achse sind die verschiedenen Konzentrationen der Serum- und FW- Proben aufgetragen und die ermittelte Zellrasenfläche in Pixeln auf der Y- Achse. Die Schwankungsbreite ist als SEM dargestellt.

Zur Veranschaulichung folgen ausgewählte Bilder fixierter Zellrasen.

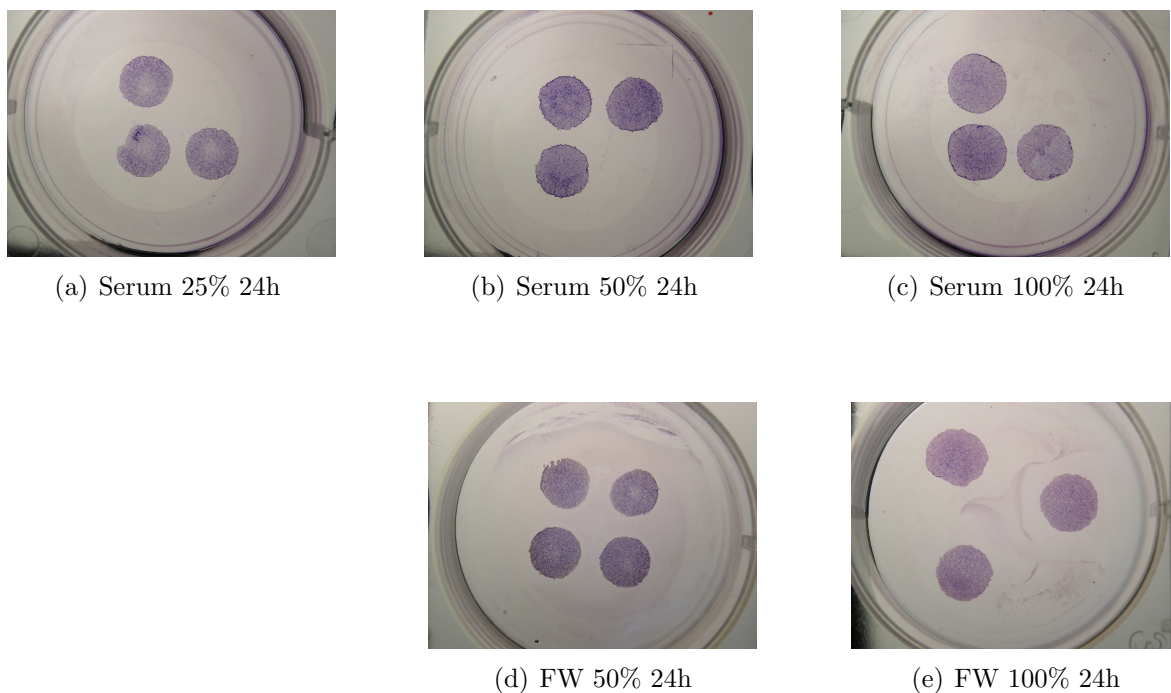


Abbildung 3.7: Zellrasen nach 24 h Inkubation mit Serum und FW

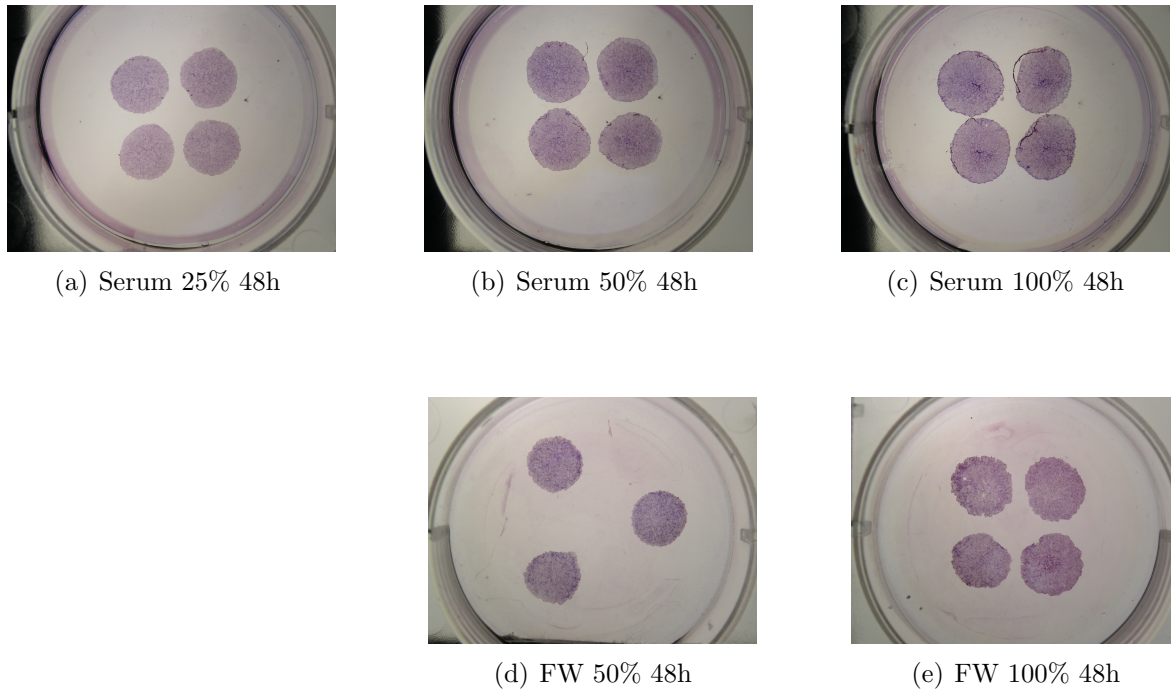


Abbildung 3.8: Zellrasen nach 48 h Inkubation mit Serum und FW

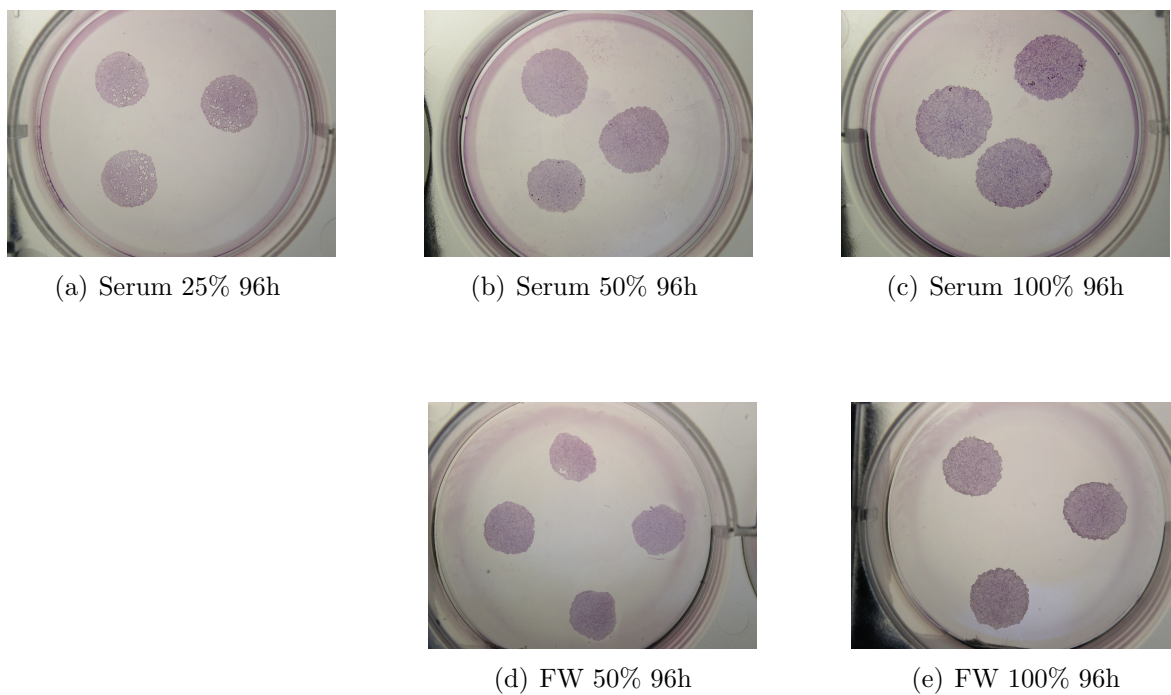


Abbildung 3.9: Zellrasen nach 96 h Inkubation mit Serum und FW

3.5 Zelltod: Apoptose- Assay

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Toxizität beider Substanzen und den Ergebnissen der Proliferations- und Migrationsversuche wurde der Zelltod untersucht. Mit dem durchgeführten “Cell Death Detection ELISA” konnte eine quantitative Bestimmung der zytoplasmatischen histon- assoziierten- DNA- Fragmente nach induziertem Zelltod vorgenommen werden. Damit wurde die Apoptose, der geregelte Zelltod, nachgewiesen.

Die Tabellen 6.7 und 6.8 zeigen die Resultate der Zelltod- ELISA- Messung und deren Auswertung, einen kurzen Überblick bietet die Tabelle 3.2. Die Zellen wurden in den Konzentrationen von 100, 50 und 6,25 % über 24 und 48 h inkubiert.

Analyt	Konz. (%)	Zeit	Apoptose (U) $\pm$ SEM	LDH (U/L) $\pm$ SEM
Serum	100	24 h	0,86 $\pm$ 0,24	1,89 $\pm$ 1,05
Serum	50	24 h	0,57 $\pm$ 0,11	0,00 $\pm$ 0,00
Serum	6,25	24 h	0,81 $\pm$ 0,16	0,52 $\pm$ 0,52
FW	100	24 h	0,79 $\pm$ 0,24	2,80 $\pm$ 1,18
FW	50	24 h	0,71 $\pm$ 0,15	2,60 $\pm$ 0,88
FW	6,25	24 h	0,43 $\pm$ 0,12	4,36 $\pm$ 0,77
Serum	100	48 h	0,27 $\pm$ 0,05	6,13 $\pm$ 2,62
Serum	50	48 h	0,25 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 1,00
Serum	6,25	48 h	0,80 $\pm$ 0,13	1,68 $\pm$ 0,82
FW	100	48 h	0,24 $\pm$ 0,06	3,60 $\pm$ 1,42
FW	50	48 h	0,47 $\pm$ 0,09	3,25 $\pm$ 1,24
FW	6,25	48 h	1,08 $\pm$ 0,77	6,36 $\pm$ 1,01

Tabelle 3.2: Zelltodmessung nach 24 und 48 h Inkubationszeit. Konz. = Konzentration; SEM = Standardfehler, Apoptose wurde als DNA- Fragment- Anreicherung in U gemessen; Werte der Apoptose- und LDH- Messung mit SEM.

Nach der Inkubationszeit von 24 h ergab sich für Inkubation mit Serum folgendes: In den Konzentrationen von 100 und 6,25 % wurde eine gleich niedrige Anreicherung von 0,8 U ermittelt. Bei der Probenkonzentration von 50 % war eine Anreicherung von 0,573 U beobachtbar. Bei einem allgemein niedrigem Apoptoseniveau von < 1 U ist dieser Unterschied zwischen den Ergebnissen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Serumkonzentrationen statistisch nicht signifikant.

Die Messung der Fruchtwasserproben nach Inkubation über 24 h zeigte Werte auf ähnlichem Niveau. Hier lag die Anreicherung nach Inkubation mit 50 und 100 % igem FW nah beieinander, mit 0,75 U vergleichbar niedrig, während bei der Konzentration von 6,25 % eine Anreicherung von nur 0,43 U zu verzeichnen war. Wie beim Serum sind auch hier die Anreicherungsunterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen nicht

signifikant. Es ist bei der Gegenüberstellung von Serum und FW keine Signifikanz der Anreicherungsunterschiede feststellbar, somit ist kein Hinweis auf apoptosebedingte Unterschiede im Proliferations- und Migrationsverhalten der Zellen unter Inkubation mit Serum oder FW gegeben.

Nach der Inkubation über 48 h kann für beide Substanzen gesagt werden, dass es zu einer Apoptoseanreicherung auf allgemein geringerem Niveau für die Konzentrationen von 100 und 50 % kam (Serum: 100 % 0,27 U und 50 % 0,25 U; FW: 100 % 0,24 U und 50 % 0,47 U). Eine geringfügig stärkere Apoptose war nach Inkubation mit 6,25 % iger Konzentration für beide Substanzen zu verzeichnen (0,8 U Serum und 1,1 U für FW), dabei ist der Unterschied zwischen Serum unverdünnt sowie in 50 % iger Konzentration gegenüber Serum in 6,25 % iger Konzentration statistisch signifikant ($p \leq 0,004$). Das zeigt eine Zunahme der Apoptose bei Abnahme der Serumkonzentration. Für die Ergebnisse der FW- Proben, mit vergleichbarem Verlauf, war keine Signifikanz der Apoptoseunterschiede messbar. Wurde die Apoptose der zwei Inkubationszeiten gegenüber gestellt, so war nach 48 h Inkubation eine signifikant geringere Apoptose ($p \leq 0,03$) in den Konzentrationen von unverdünnter (für beide Substanzen) und 50 % iger Testlösung (nur für Serumproben) messbar als nach Inkubation über 24 h, Tabelle 6.9. Die Unterschiede der Apoptoseanalyse zwischen Serum und FW waren nur vereinzelt signifikant, z.B. in 50 % iger Konzentration nach Inkubation über 48 h, aber es waren keine klaren generellen Unterschiede messbar. Damit ergab die Apoptosemessung keinen Hinweis auf die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse in der Proliferation und Migration.

3.5.1 Zelltod: Nekrose- Beurteilung

Als Nekroseindikator wurde der Parameter Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand benutzt. Die Laktatdehydrogenase ist ein zytoplasmatisches Enzym, das bei Zellnekrose freigesetzt wird und als unspezifischer Parameter zur Diagnostik genutzt wird [80].

Bei der Betrachtung der Messergebnisse (Tabelle 3.2) nach der Inkubation über 24 h fällt auf, dass bei den Serumproben in der unverdünnten Konzentration ein hoher Mittelwert von 1,89 U/l mit einem hohen Standardfehler von 1,05 U/l gemessen wurde. Bei der Konzentration von 50% igen Serumproben war dagegen kein LDH und bei der 6,25 % igen Konzentration nur ein geringes LDH- Niveau von 0,52 U/l messbar. Nach Inkubation mit FW über 24 h wurden höhere LDH- Konzentrationen in allen Verdünnungen als nach Inkubation mit Serum, gemessen: unverdünnt 2,8 U/l, 50 % 2,6 U/l und bei 6,25 % 4,36 U/l. Innerhalb der Ergebnisse nach Inkubation mit

Serum- oder FW- Proben bestanden keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 6.10). In der Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Testsubstanzen war ein signifikanter Unterschied bei den Konzentrationen von 50 % und 6,25 % messbar, siehe Tabelle 6.10.

Die Analyse der LDH- Messung nach Inkubation über 48 h ergab ähnliche Verhältnisse für beide Testsubstanzen, aber auf einem etwas höherem Niveau als nach Inkubation über 24 h. Nach der 48- stündigen Inkubation mit unverdünntem Serum war eine LDH- Konzentration von 6,13 U/l gemessen worden, bei FW von 3,6 U/l, während nach Inkubation mit 50 % iger Serumlösung eine Konzentration von 1 U/l, bei FW von 3,25 U/l, festgestellt wurde. Die Inkubation mit der 6,25 % igen Serumlösung führte zur Messung von 1,68 U/l LDH, FW von 6,36 U/l ($p \leq 0,002$). Die Unterschiede innerhalb der restlichen Ergebnisse nach Inkubation mit Serum- oder FW- Proben waren nicht statistisch signifikant (Tabelle 6.10 und 6.11). Im Vergleich der Ergebnisse nach Inkubation über 24 und 48 h konnten für beide Testsubstanzen keine signifikanten Veränderungen ermittelt werden, es lag also kein Hinweis auf nekrosebedingte Unterschiede in der Unterstützung der Proliferation und Migration der Zellen vor.

4 Diskussion

Tränenersatz mit künstlichen Tränenersatzmitteln ist die meist genutzte Therapie bei Sicca- Symptomatik. Die meisten Präparate bestehen aus Elektrolyten, Oberflächenstabilisatoren, viskositätsfördernden Substanzen und Stoffen mit schützenden Eigenschaften. Diese Kombination an Inhaltsstoffen versucht eine ideale Balance zu halten zwischen maximaler Tränenfilmstabilität und Augenoberflächen- Retention mit minimaler Sichtveränderung und Kratzerscheinungen auf der Kornea. Bisher ist es nicht gelungen optimale Tränenersatzmittel pharmazeutisch herzustellen, da die künstlichen Tränen die epitheliotrophe Kapazität der Tränen nicht vollständig substituieren können.

Serum wird als Tränenersatzmittel genutzt und ist der flüssige Überstand nach Zentrifugation von Vollblut. Serumaugentropfen erfüllen beide Anforderungen an AT, sie fungieren als Gleitmittel und ermöglichen die Ernährung der Korneazepithelzellen, da sie Wachstumsfaktoren, Vitamine und Proteine enthalten. Serum wurde das erste Mal 1984 von Fox et al [18] bei trockenen Augen appliziert. Dieser Weg wurde zuerst nicht weiterverfolgt, sondern erst 15 Jahre später von Tsubota erneut aufgegriffen. Er hatte erkannt, dass Serum aufgrund der enthaltenen Wachstumsfaktoren, Vitaminen und Fibronektin direkt epitheliotroph wirken kann [25], [83]. Später wurde ebenfalls eine positive Wirkung bei der Behandlung von schwerer Sicca- Symptomatik [82],[25], persistierenden epithelialen Defekten [83], Graft- versus- Host- Disease mit trockenem Auge [57], [66], Oberflächenrekonstruktionen [84] und bei anderen Augenoberflächenerkrankungen [14], [48] gefunden. Bei Serum konnte eine wesentlich geringere Toxizität im Vergleich zu pharmazeutischen AT belegt werden [28],[21]. Zusätzlich ist von einem indirekt trophischen Effekt auszugehen, da an humanen Keratozyten nach Inkubation mit Serum eine vermehrte Transkription von Wachstumsfaktorrezeptoren beobachtet wurde [15], [28].

Humanes Fruchtwasser wird seit 1996 [44] untersucht, nachdem festgestellt wurde, dass Fruchtwasser eine ähnliche Proteinzusammensetzung aufweist wie Humane Amnionmembran [90], die seit 1940 zur Defektdeckung bei konjunktivalen Defekten genutzt wird [13]. Alle Studien zu Humanem Fruchtwasser erfolgten bisher im Tiermodell, wobei für FW im Vergleich mit isotoner Salzlösung eine gute Defektheilung beobachtet wurde [10], [29]. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen per Amniozentese

gewonnenem Fruchtwasser und Fruchtwasser, das bei Geburt aufgefangen wurde, ermittelt werden [29].

Nachdem Humanes Fruchtwasser im Tiermodell im Vergleich mit isotoner Kochsalzlösung getestet wurde, sollte in dieser Studie Humanes Fruchtwasser im Vergleich mit Serum- AT an humanen Korneaepithelzellen untersucht werden. Serum- AT werden wie AT aus isotoner Kochsalzlösung in der Klinik eingesetzt, haben aber den Anwendungsschwerpunkt bei Ulzerationen der Kornea, während isotone Kochsalzlösung- AT vor allem zur Augenspülung eingesetzt werden. Im Vergleich mit der Kochsalzlösung zeigte Fruchtwasser eine signifikant bessere Förderung bei der Defektheilung [10],[29]. Nun interessierte uns die Wirkung von Fruchtwasser im direkten Vergleich mit Serum- AT, die schon im klinischen Alltag benutzt werden, bei der Förderung von Proliferation und Migration an HCE- Zellen. Zu diesem Zweck wurden SV40- immortalisierte HCE- Zellen gezüchtet und an diesen die vergleichenden Proliferations- und Migrationsexperimente durchgeführt.

Die verwendeten SV40- immortalisierten HCE- Zellen wurden von Araki- Sasaki hergestellt und von Sharif et al hinsichtlich ihrer Charakteristik untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die SV40- immortalisierten HCE- Zellen durch das Simian- Virus 40 (SV40) ein sogenanntes großes T- Antigen produzieren, was die Wirkung vom Protein p53 und pRb durch Komplexierung aufhebt. Damit ist vorerst kein geregelter Zell- tod - Apoptose - mehr möglich [65],[2]. Dieses T- Antigen kann jedoch über den M1- und M2- Mechanismus inaktiviert werden, so dass die Zellen die Eigenschaften normaler HCE- Zellen behalten [75]. Die SV40- immortalisierten Zellen produzieren keine Viruspartikel und verursachen keine Tumorentstehung in umgebendem Gewebe, sie sind in flüssigem Stickstoff einfrierbar und zeigen keinerlei Veränderungen des Wachstumsverhaltens nach dem Wiederauftauen. Ihre Populationsverdopplungszeit beträgt 24,4 h, was für virustransformierte Zellen sehr langsam ist und diese Zellen weisen die phänotypischen, morphologischen, biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften wie nichttransformierte HCE- Zellen auf. Sie sind deshalb sehr gut für Studien verwendbar [2],[74].

4.1 Chemische Eigenschaften von Serum und Fruchtwasser

Der Hauptgrund für die Messung der chemischen Eigenschaften war der Ausschluss von unphysiologischen pH- Werten oder Osmolaritäten, da diese toxisch auf die HCE-

Zellen wirken [21], [88].

4.1.1 pH- Wert

Gesunde humane Tränen haben einen durchschnittlichen pH- Wert von $7,45 \pm 0,16$, [30]. Die meisten herkömmlichen künstlichen Tränenersatzmittel variieren in ihrer Zusammensetzung und ihrer Viskosität, aber sind vom pH- Wert neutral bis leicht sauer, also der natürlichen Träne ähnlich. Viele Patienten mit Keratokonjunktivitis sicca (KKS) klagen über Brennen der AT, die die allgemeine Symptomatik verschlimmert anstatt zu lindern. Werden Puffer- Systeme in den AT verwendet und damit der pH- Wert der AT bis auf 8,4 angehoben, so werden diese künstlichen Tränen von den Patienten besser vertragen und eine subjektive Linderung der Symptomatik erreicht [89], [63], [53].

Der pH- Wert der Serumproben lag bei $7,43 \pm 0,01$ SEM und der pH- Wert der FW- Proben bei $7,57 \pm 0,03$. Die Serumproben sind also pH- neutral, während der pH- Wert der FW- Proben zwar leicht alkalisch ist, aber noch im tolerierten oberen pH- Grenzbereich von humanen Zellen liegt. So war zu klären, ob dieser leicht alkalische pH- Wert Auswirkungen auf die HCE- Zellen im Zellkulturmodell hat. Beim Vergleich des Zellwachstums von Serum zum optimalen Nährmedium Shem X ist festzustellen, dass Serum in unverdünntem Zustand fast 80 % des Wachstums unter Shem X erreicht, während FW ein maximales Zellwachstum von 31 % erreicht. In Anbetracht der Ergebnisse der Zelltod- Untersuchung, die auf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen, die mit Serum inkubiert wurden, und den Zellen, die mit FW inkubiert wurden, hindeuten, kann davon ausgegangen werden, dass dieser leicht alkalische pH- Wert keine toxische Wirkung auf die HCE- Zellen hat. Da bei künstlichen AT die pH- Werte bis auf 8,4 angehoben werden und sie keinen destruierenden Effekt auf die Korneaepithelzellen zeigen, unterstützt das die Unbedenklichkeit in der Anwendung beider Testsubstanzen [89], [63], [53].

4.1.2 Osmolarität

Die Osmolarität ist die Konzentration an osmotisch aktiven Teilchen pro Liter Lösung. Osmol ist das molekulare Gewicht einer Lösung in Gramm, dividiert durch die Anzahl an Ionen oder Partikel, in die die Lösung dissoziiert. Die Osmolarität von gesunden humanen Tränen liegt bei 300 mOsm/L [24] [4], die humane Serumosmolarität aus unseren Messungen bei $299,5 \pm 1,6$ mOsm/L und FW hat eine Osmolarität von $290,5 \pm 3,42$ mOsm/L. Damit liegen die Messwerte im Bereich der gesunden Träne. Patienten mit KKS zeigen im Vergleich dazu Tränenosmolaritäten von $343 \pm 32,3$ mOsm/L und es konnte gezeigt werden, dass die Hyperosmolarität ein wichtiger induzierender

Faktor dieser Erkrankung mit ihren Auswirkungen auf Kornea und Konjunktiva ist [24]. Deswegen werden oftmals hypotone Lösungen als AT verwendet, da diese die Symptomatik und den Zustand der Kornea verbessern.

Diese Datenlage zeigt, dass die gemessenen Osmolaritäten beider Substanzen im physiologischen Bereich liegen und deswegen davon ausgegangen werden kann, dass sie nicht toxisch wirken.

4.2 Endpunktassays

Bei den Experimenten zur Untersuchung des Proliferations- und Migrationsverhaltens wurde als Hauptergebnis festgestellt, dass die Inkubation der HCE- Zellen mit Serum zu besseren Ergebnissen führt, als die Inkubation mit Fruchtwasser. Die maximale Proliferationsförderung konnte durch Inkubation mit unverdünntem Serum erzielt werden. Serum bleibt aber dabei bezüglich der Proliferationsförderung hinter dem optimalen Nährmedium zurück. Fruchtwasser erreicht das Proliferationsniveau von Serum nicht, liegt aber noch über dem Niveau der Negativ- Kontrolle mit BSS. Dass FW ein höheres Niveau der Proliferationsförderung als BSS erreicht, wurde in den Experimenten am Tiermodell mit isotoner Salzlösung schon gezeigt [29]. Somit scheint Tsubotas Ansatz, das gewonnene Serum zu verdünnen, fragwürdig, auch wenn Serum im Vergleich zur natürlichen Träne von den Inhaltsstoffen wie TGF- β , Vitamin A und Vitamin E, sowie von Fibronectin weit mehr als die fünffache Konzentration erhält und durch die Verdünnung eine Annäherung zur natürlichen Träne erreicht werden kann [83], [82]. Die Ergebnisse der Serum- Experimente stimmen mit bisher veröffentlichten Daten überein [12]. Für beide Substanzen ist ersichtlich, dass die Konzentration einen starken Einfluss auf die Proliferation hat. Je stärker die Verdünnung mit BSS war, umso geringer war die Proliferationsförderung. Dies verlief jedoch nicht linear und war für die Proben nach Inkubation mit Serum auf einem deutlich höheren Niveau messbar als nach Inkubation mit FW- Proben. Nach Inkubation mit beiden Substanzen war in den Verdünnungen von 6,25 und 0 % eine signifikant geringere Proliferation messbar als nach Inkubation mit unverdünnten, 50 und 25 % igen Probenlösungen.

Auf der Basis der Proliferationsergebnisse wurden die drei geeignetesten Konzentrationen herausgesucht, um damit den Kolonie- Dispersions- Assay durchzuführen. Die Migrationsförderung durch FW konnte nur in den Konzentrationen von 100 und 50 % bestimmt werden, da das Material nicht für weitere Versuche ausreichte. Die Migrationsergebnisse sind denen der Proliferation ähnlich. Die Inkubation mit Serum führte zu einer stärkeren Migrationsförderung als die Inkubation mit FW. Bei den ersten beiden Inkubationszeiten von 24 und 48 h liegen die Ergebnisse beider Substanzen in einem ähnlichen Niveau, ohne signifikante Unterschiede. Erst im weiteren Inkubationsverlauf

zeichnet sich ein deutlicher Unterschied ab. Nach Inkubation über 96 h mit Serumproben ist ein deutlicher und nun auch statistisch signifikanter Anstieg der Migration zu messen, siehe Tabelle 6.6. Die Zellen unter FW- Inkubation über 96 h zeigen keinen weiteren Migrationsanstieg, im Gegenteil, sie sinken sogar leicht unter das Niveau der Migration nach 48h ab. Dies mag an der Zusammensetzung liegen, die zu einem wesentlich größeren Teil aus Wasser besteht als beim Serum. Der Unterschied in der Migrationsförderung zwischen Serum- und FW- Proben ist in den Ergebnissen nach 96 h Inkubation statistisch signifikant, siehe Tabelle 6.6.

Es ist davon auszugehen, dass dieses Proliferations- und Migrationsverhalten durch die unterschiedliche Zusammensetzung mit epitheliotrophen Faktoren verursacht wird. Für die Inhaltsstoffe wurden Werte wie in der Literatur vorbeschrieben ermittelt, außer für Vitamin A und Fibronektin, wo im Serum (Vitamin A) und im FW (Vitamin A und Fibronektin) geringere Konzentrationen gemessen wurden [9],[27],[28],[34],[36],[42],[48],[80]. In früheren Studien konnte für EGF gezeigt werden, dass es die Proliferation und Migration unterstützt und gleichzeitig antiapoptotisch wirkt [3],[11],[41],[59],[68],[71]. Es wurde im FW eine signifikant geringere Menge EGF als im Serum gemessen, siehe Tabelle 3.1. Die EGF- Konzentration des FW lag in unseren Messungen unterhalb bisher gemessener Konzentrationen [31], doch auch die in der Literatur beschriebenen Werte (aus der 15. - 22. Schwangerschaftswoche) erreichen die Menge des EGF im Serum nicht. EGF stimuliert die Mitose der Zellen, was zu stärkerer Proliferation führt [86]. Dies ist bei der Inkubation mit Serum beobachtbar. Serum, das mehr EGF enthält als FW, fördert die Proliferation der HCE-Zellen über alle Inkubationszeiten stärker als FW. Brian berichtet über die gezielte Hemmung von EGF mit anschließender Inhibition der Zellmigration, da EGF die Haptotaktik der Zellen stimuliert, was bei Hemmung des EGF- Rezeptors wegfällt [6],[91]. Dabei wird vom EGF vor allem die Zellmotilität über die Förderung der Ausbildung von Lamellopodien unterstützt, indem die Actin- Polymerisation durch die EGF-Signalkaskade verstärkt wird, was zu vermehrter Lamellopodienbildung und damit lamellopodialer Protrusion führt [7]. Die Ergebnisse der Proliferationsversuche nach Inkubation mit FW erreichen nicht das Niveau der Ergebnisse nach Inkubation mit Serum. In den Migrationsassays jedoch werden in den ersten beiden Inkubationszeiten von 24 h und 48 h vergleichbare Ergebnisse erzielt. Erst in der Langzeitinkubation von 96 h zeigen mit Serum (höherer EGF- Konzentration) inkubierte Zellen eine wesentlich stärkere Migration als Zellen, die mit FW (geringe EGF- Konzentration) inkubiert wurden.

Ein ebensolcher Zusammenhang wurde für Vitamin A gefunden. Vitamin A erfüllt verschiedene Funktionen und hat unter anderem in allen eukarioten Zellen einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression. Dies geschieht über die Bindung an den “retinoid acid receptor” (RAR) für die All-trans-retinoid-Säure und über den “retinoid X

receptor" (RXR) für die 9-cis-retinoid-Säure. Diese Heterodimere können an regulatorische Regionen von Chromosomen binden, "retinod acid response elements" (RARE), und beeinflussen dadurch die Transkription von Genen. Damit hat Vitamin A Einfluss auf die Proteinbiosynthese und Zelldifferenzierung, sowie auf die Transkription von Wachstumshormonen [46]. Auch wenn in unseren Experimenten Korrelationen in dem Sinne gefunden wurden, dass eine relativ hohe Konzentration an Vitamin A mit besseren Proliferations- und Migrationsergebnissen vergesellschaftet ist, wurde damit keine der oben genannten Funktionen spezifisch untersucht. Es gibt dagegen Untersuchungen, in denen berichtet wurde, dass Vitamin A die Proliferation möglicherweise zugunsten der stärkeren Zelldifferenzierung hemmt, [83],[85]. Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass dieser Einfluss nicht stark genug ist, um damit die Proliferation effektiv zu unterbinden. Schliesslich proliferieren und migrieren die Zellen nach Inkubation mit Serum, das einen hohen Vitamin A- Gehalt aufweist, signifikant besser als nach Inkubation mit FW. Da allerdings keine Einzeluntersuchungen mit reinen Vitamin- A- Lösungen erfolgt sind, sondern Vitamin A einer von vielen Bestandteilen beider Testsubstanzen ist, ist keine eindeutige Einzelwirkung von Vitamin A nachweisbar. Am "in-vivo-Auge" wurde von Pfister/ Burstein gezeigt, dass Vitamin- A Mangel zur Austrocknung der Augenoberfläche führt [60]. Dies gilt aber nicht für Zellkulturbedingungen, da die Zellen immer von Nährmedium bzw. Testsubstanz bedeckt sind, so dass diese Auswirkung eines eventuellen Vitamin A- Mangels nicht untersuchbar war. Vitamin E, das antioxidativ wirkt, lag im FW unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Messung, im Vergleich dazu wurde im Serum eine höhere Konzentration, im Einklang mit dem Literaturwert, ermittelt. Die deutlich besseren Proliferationsergebnisse nach Inkubation mit Serum, verglichen mit den Ergebnissen nach Inkubation mit FW, können darauf hindeuten, dass Vitamin E die Proliferation unterstützt. Bei der Migration scheint es jedoch keinen Einfluss zu haben, oder er wirkt sich erst sehr spät aus, da FW und Serum in den 24 und 48 h Inkubationen zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Ist die antioxidative Wirkung jedoch erst in langen Inkubationszeiten als Zellschutz vonnöten, könnte dieser Unterschied in der Zusammensetzung die signifikant unterschiedlichen Migrationsergebnisse nach 96- stündiger Inkubation erklären. Vitamin E kann Apoptose verhindern [5], und gerade bei der Inkubation über längere Zeiträume kann dies ein wichtiger Faktor sein. Andererseits ist Vitamin E sowohl im Serum als auch im FW, insgesamt in niedriger Konzentration zu finden, so dass ein alleiniger Effekt von Vitamin E mit den durchgeführten Versuchen nicht nachweisbar ist.

Ein weiter Faktor ist das TGF- β . Dessen antiproliferative Wirkung auf Korneaepithelzellen ist bekannt. Es gibt insgesamt fünf Isoformen, von denen nur TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 in Säugetieren exprimiert werden. Das in unseren Versuchen gemessene TGF- β_1 hat dabei eine geringere antiproliferative Wirkung als TGF- β_2 [83],[32],[28].

Die Zellen unter Inkubation mit Serum, das mehr TGF- β enthält als FW, proliferierten in allen Inkubationszeiten stärker als die Zellen unter Inkubation mit FW. Es wurde von Haber gezeigt, dass TGF- β an der Fibroblastenaktivierung beteiligt ist, die für die Wundheilung benötigt wird [26],[39],[64]. Desweiteren stimuliert TGF- β die Fibronectin- mRNA- Bildung, was zu einem Anstieg der Fibronectinkonzentration führt. Fibronectin wird in die extrazelluläre Matrix eingelagert und dient als Adhäsionsmolekül [79]. Das kann eine mögliche Erklärung dafür bieten, dass es zu ähnlichen Migrationsergebnissen nach 24 und 48- stündiger Inkubation mit beiden Testsubstanzen kam. Nach Inkubation über 96h scheint dieser Effekt von TGF- β entweder aufgehoben zu sein, oder im FW ist nicht genügend TGF- β vorhanden um diese Migrationsförderung aufrecht zu erhalten. Zumindest findet keine Migrationszunahme unter Inkubation mit FW über 96h statt, während die Zellen unter Inkubation mit Serum zunehmend migrierten. Somit war kein hervortretender Einzeleffekt von TGF- β messbar.

Neben EGF und TGF- β ist Fibronectin ein wichtiger epitheliotropher Faktor. Fibronectin, ein disulfidhaltiges Glykoprotein, wurde 1948 von Morrison et al. entdeckt und zuerst "Could insoluble globulin" (CIG) genannt [52]. Seit den achtziger Jahren wurde Fibronectin in verschiedenen Studien an Tieren und auch in einigen klinischen Versuchen appliziert und auf seine Rolle bei der Heilung von kornealen Defekten getestet. Diese Ergebnisse zeigten, dass Fibronectin effektiv die Reepithelialisierung bei Kornea-defekten unterstützt [54],[56],[61]. Nishida konnte dann diese Rolle genauer definieren, indem seine Funktion als Zelladhäsionsverstärker, als chemotaktisches Agens und Motilitätsvermittler analysiert wurde. Damit ist es ein wichtiger Mediator der Zellmigration [20],[16],[76]. Die Unterstützung des Zell- Zell- Kontakts erfolgt von Fibronectin aus dem Serum und von Fibronectin aus FW gleichermaßen, so dass es keinen Einfluss hat, das Fibronectin aus FW stärker glykosyliert ist als Serum- Fibronectin [70]. Zusätzlich wird die Proteinsynthese und die Mitose stimuliert [55],[40]. Der Verdacht, das hohe Fibronectinkonzentrationen die Proliferation zugunsten der Migration hemmen [28], kann mit unseren Ergebnissen nicht bestätigt werden. Serum, das eine deutlich höhere Konzentration an Fibronectin aufweist als FW, fördert die Proliferation stärker und scheint in dieser Wirkung nicht gehemmt zu sein. Bei der eher geringen Fibronectinkonzentration im Fruchtwasser wurde zwar eine stärkere Migrations- als Proliferationsförderung festgestellt, aber eine eindeutige Hemmung der Proliferation war nicht ersichtlich. Bezüglich des Migrationsverhaltens untermauern unsere Experimente die bisherigen Erkenntnisse, dass Fibronectin ein wichtiger Faktor bei der Zellmigration ist. Die Zellen, die mit Serum (hoher Fibronektingehalt) inkubiert wurden, migrierten stärker, als diejenigen, die mit FW inkubiert wurden. In der längsten Inkubationszeit von 96 h wird der Unterschied zwischen beiden Substanzen signifikant ($P \leq 0,0001$). In Anbetracht der Tatsache, dass Fibronectin im FW einer der Inhaltsstoffe mit höherer

Konzentration ist, kann damit das Migrationsverhalten der Zellen unter FW nach 24 und 48h erklärt werden, das dem Migrationsverhalten unter Inkubation mit Serum gleicht. Dass die Migration unter FW nach 96 h Inkubation stagniert, kann womöglich in dem Zusammenhang stehen, dass FW, bei relativ hoher Konzentration an Fibronektin, eine sehr niedrige Konzentration an EGF aufwies, Serum dagegen eine signifikant höhere Konzentration an EGF und Fibronektin enthält. Es konnte von Brian gezeigt werden, dass das Zusammenspiel von EGF und Fibronektin für den Migrationserfolg von Bedeutung ist [6]. Die Zell- Migration ist ein Prozess, der durch die Beziehung zwischen der Zell- Adhäsion und dem lamellopodialen Vorschub gekennzeichnet ist. In Abwesenheit von EGF wurde gezeigt, dass die Zellmotilität keine qualitative Abhängigkeit von der Fibronektinkonzentration hat, bei vorhandenem EGF dagegen schon [7]. Ist EGF bei intaktem EGF- Rezeptor vorhanden, führt eine niedrige Fibronektinkonzentration zu geringerer und eine hohe Fibronektinkonzentration zu hoher Zellmotilität. Neben dem Zusammenspiel von EGF und Fibronektin steht auch das TGF- β in Beziehung zum Fibronektin, indem es unter anderem die Zusammenlagerung von exogenem Fibronektin fördert, was wiederum zur Verbesserung der Zell- Adhäsion führt. Desweiteren fördert TGF- β , wie oben beschrieben, die Fibronektinsynthese. Da im Serum eine höhere Konzentration an Fibronektin, EGF und TGF- β enthalten ist, liegen damit die günstigeren Voraussetzungen für eine stärkere Migration vor. Neben der einerseits besseren Förderung der Migration durch Inkubation mit Serum (hohe nutritive Potenz), ist andererseits auch der Zelltod, durch eventuell zu geringer nutritiver Eigenschaft des Fruchtwassers, eine mögliche Ursache der Migrationsstagnation der Zellen, unter Inkubation mit FW.

Desweiteren bestimmten wir die Konzentration an Glukose in beiden Präparaten, mit dem Ergebnis, dass Serum geringfügig, aber signifikant, mehr Glukose enthält als FW. Glukose, als Energielieferant der Zellen zur ATP- Gewinnung, bildet die Grundvoraussetzung für die Zellaktivität, ohne dabei einen speziellen Einfluss auf die Art der energieverbrauchenden Prozesse, ob Proliferation oder Migration, zu haben. ATP wird vor allem in der Proliferation benötigt und ein hoher ATP- Gehalt der Zelle zeigt einen aktiven Stoffwechsel an und diene als Marker für die Proliferation. Da die Proliferationsunterschiede zwischen Serum und Fruchtwasser aber enorm sind, im Vergleich zu dem Unterschied der Glukosekonzentrationen in beiden Substanzen, kann der alleinige Einfluss der Glukose keine bestimmende Rolle spielen. Hier kommen wieder die Wechselwirkungen der einzelnen Inhaltsstoffe zusammen. So stimuliert TGF- β die Glukoseaufnahme in die Zelle, was unter dem Einfluss von EGF noch verstärkt wird [33]. Serum hat eine höhere Konzentration an TGF- β und EGF, so dass eine stärkere Glukoseaufnahme in die Zelle möglich ist als bei FW. Somit stand womöglich mehr Glukose zur Verfügung. Dies kann vor allem in der Migration eine mögliche Erklärung der deutlichen Unterschiede in den Ergebnissen nach 96- stündiger Inkubation sein. An Ratten

wurde zudem gezeigt, dass eine hohe Glukosekonzentration die Fibronektin- Synthese stimuliert [45]. Wenn dies auf die Korneaepithelzellen übertragbar ist, kann es damit als weitere Erklärung der stärkeren Proliferations- und Migrationsförderung durch Serum dienen, da Serum an beiden Inhaltsstoffen mehr enthält als FW.

Für die Ernährung und Stabilisierung des Korneaepithels sind aber nicht nur die schon genannten Wachstumsfaktoren wichtig. Im gesunden Tränenfilm bilden in der wässrigen Schicht des Tränenfilms die Proteine den größten Anteil. Sie haben eine Schutz- und Reinigungsfunktion, als wasserbindende Proteine, als Transportproteine und in Form von Enzymen und Immunglobulinen. Sie sorgen damit für eine glatte Oberfläche und somit für eine gute Gleitschicht und hochwertige optische Transparenz [43],[65]. Im Vollblut haben Proteine als Immunglobuline, Enzyme, Transportproteine, Gerinnungssubstanzen, pH- Wert- Puffer und zur Erhaltung des osmotischen Drucks ähnliche Aufgaben. Dabei nimmt Albumin eine besondere Rolle ein, da es den osmotischen Druck und die Viskosität des Blutes erhöhen kann. Im Fruchtwasser haben die Proteine, die hauptsächlich von der Mutter stammen, nicht nur immunologische Funktion, sondern auch eine nutritive Funktion. Dies geht aus Studien hervor, bei denen der Zusammenhang von Schluckstörungen und einer daraufhin folgenden Wachstumsretardierung untersucht wurden [69]. Bei einer unkomplizierten Schwangerschaft liegt der Proteingehalt zwischen 0,2 und 7 g/l [36],[34]. Die geringe Menge wird dadurch erklärt, dass der Fet Fruchtwasser schluckt und damit die Proteine aus dem FW aufnimmt [81] und andererseits von vornerein eine niedrigere Konzentration vorhanden ist, als im mütterlichen Serum [35]. Dieser Konzentrationsunterschied von Gesamtproteingehalt im Serum und im FW konnte mit unseren Messungen ebenfalls festgestellt werden. Bei der Untersuchung der FW- Zusammensetzung konnte Oliveira Albuminkonzentrationen von $3,5 \pm 1,2$ mg/l messen [58], in unseren Messungen lag die Konzentration unter der Nachweisgrenze von 4 g/l, so dass nur die Albuminkonzentration im Serum exakt gemessen werden konnte. Serum und FW unterscheiden sich vor allem im Gesamtproteingehalt. Im Serum macht Albumin mehr als die Hälfte des Proteingehalts aus. Die Proteine bilden für die Epithelzellen die Grundlage der osmotischen Homöostase. Besonders bei Zunahme der Inkubationszeit wird die Bedeutung ersichtlich. In der Proliferation wie auch in der Migration wurden nach Inkubation mit FW bei den Inkubationszeiten von 48 und 96 h, im Vergleich zum Serum, wesentlich schlechtere Ergebnisse gemessen. Dies kann möglicherweise daran liegen, dass die Zellen unter Inkubation mit FW nur in den kürzeren Inkubationszeiten die osmotische Homöostase optimal aufrecht halten konnten und somit zur Proliferation und Migration fähig waren. Bei den längeren Inkubationszeiten könnte es durch Verschiebung der extrazellulären Flüssigkeit nach intrazellulär, bei geringem onkotischen Druck des FW, zu hypertoner Hydratation der HCE-Zellen geführt haben, so dass sie in ihrer Zellaktivität stagnierten. Zudem ist bei geringer Proteinkonzentration auch die Menge an Transportproteinen geringer, so dass

es bei Inkubation mit FW zu einer Malnutrition der HCE- Zellen, bei allgemein geringer Konzentration nutritiver Substanzen im FW, kam.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für beide Testsubstanzen keine Toxizität festgestellt wurde. Die Unterschiede in der Migrations- und Proliferationsförderung sind durch die verschiedensten Wirkungen und Wechselwirkungen der einzelnen Inhaltsstoffe beider Substanzen erklärbar, ohne dass in unseren Experimenten ein Faktor mit seiner alleinigen Wirkung isoliert betrachtet werden konnte. Deutlich ist jedoch, dass Serum von allen Inhaltsstoffen höhere Konzentrationen enthält und sowohl die Proliferation, als auch die Migration stärker fördert als FW.

4.3 Zelltodanalyse

Der regulierte Zelltod, die Apoptose, ist ein wichtiger Mechanismus gegen virale Infektionen und gegen anderweitige Zellveränderungen wie z.B. der Krebsentstehung. Dieser Zelltodvorgang wird über die Expression von p53 reguliert und induziert. P53 zählt zu den Tumorsuppressorgenen und wird bei Zellschädigung exprimiert. Er funktioniert als Transkriptionsfaktor für “Zelltodproteine” oder durch Unterdrückung des bcl2- Gens, das für das Überleben der Zelle wichtig ist [51]. Dies ist bis jetzt aber noch nicht vollständig geklärt. Der Vorgang der Apoptose ist durch Chromatinkondensation, DNA- Fragmentation mit Karyopyknose und damit Verlust der Lebensfähigkeit gekennzeichnet [87]. Den Vorgang der DNA- Fragmentation nutzten wir in der Apoptosemessung aus, da der verwendete ELISA im Zytoplasma vorkommende Histonsasoziierte DNA- Fragmente (Mono- und Oligonucleosomen) nach induziertem Zelltod nachweist.

Die Nekrose ist das Gegenstück zum regulierten Zelltod, sie läuft völlig unreguliert ab und wird durch physikalische, chemische und mechanische Schädigung, sowie durch Erreger oder Sauerstoffmangel verursacht. Von Frisch und Francis (1994) wissen wir, dass die Anhaftung auf dem Boden der Zellkulturschale für das Überleben der adhären Zellen vonnöten ist. Wird diese Anhaftung verhindert, so wird, selbst bei immortalisierten Zellen, der Zelltod induziert [19]. Dabei wird meist die Zellmembran zerstört, was zum “Auslaufen” der Zelle und damit zu ihrem Tod führt. Bei Desintegrität der Zellmembran werden Enzyme freigesetzt, die normalerweise nur innerhalb der Zellen vorhanden sind, z.B. die Laktatdehydrogenase (LDH).

Bei den Ergebnissen fällt auf, dass bei Serum und FW nach 24 und 48 h annähernd gleich viele apoptotische Zellen gefunden wurden (siehe Tabelle 3.2). Das zeigt, dass es bei der Inkubation mit beiden Stoffen zu einem ähnlichen Apoptoseverhalten kommt.

Deutlich wird auch, dass bei beiden Stoffen nach 48 h, gegenüber der Messung nach 24 h, eine statistisch signifikant geringere Apoptose messbar war. Hiervon ausgenommen ist die Konzentration von 6,25 % igem Serum und FW. Die Ergebnisse der LDH-Messung zur Analyse der Nekrose zeigen im Vergleich zur Apoptosemessung ein umgekehrtes Bild. Nach 24 h zeichnete sich eine eher geringe Nekrose ab, die bei den FW- Proben stärker als bei den Serumproben war. Nach Inkubation über 48 h stieg die LDH- Konzentration als Nekrosemarker an, bei den FW- Proben wieder stärker als bei den Serumproben. Dieser Anstieg ist aber nicht signifikant. Nach Inkubation mit unverdünntem Serum wurden die höchsten LDH- Konzentrationen gemessen, mit einem Maximum nach 48 h. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren es in den durchgeführten Versuchen aber die unverdünnten Testsubstanzen, die zu den stärksten Migrations- und Proliferationsergebnissen führten.

Nach der Betrachtung einiger Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit der Proliferation und Migration der HCE- Zellen soll nun deren Einfluss auf den Zelltod dargestellt werden. EGF und sein Rezeptor verhindern bei intakter Funktion den Zelltod. Bei Inhibition des EGF- Rezeptors, also Wegfall der EGF- Wirkung, kommt es zu ausgedehntem Zelltod mit verschiedenen Merkmalen der Apoptose. Das Überleben der Keratinozyten wird also unter anderem EGF- abhängig reguliert [67]. Da FW signifikant weniger EGF enthält als Serum, wäre zu erwarten, dass Inkubation mit FW zu signifikant mehr Apoptose führt, was aber nicht der Fall ist. Das bedeutet, das EGF nicht allein Zellwachstum und Apoptoseinhibition reguliert. TGF- β , das modulierend auf EGF wirkt, aber als Einzelsubstanz wohl keinen direkten Effekt auf Proliferation und Migration hat [50], zeigt hier ebenfalls keine direkte Wirkung. Würde es die Funktion des EGF reduzieren, wie es von Tsubota angenommen wird [83],[32],[28], wäre zu erwarten, dass HCE- Zellen nach Inkubation mit Serum (enthält mehr EGF und TGF- β als FW) schlechter proliferieren und migrieren und dass damit auch die nutritive und zellschützende Komponente reduziert wird und mehr Zellen in die Apoptose oder Nekrose gehen. Da dies nicht beobachtbar war, kann von keinem wesentlichen Einzeleffekt des TGF- β bezüglich Apoptose oder Nekrose ausgegangen werden.

Ein weiterer epitheliotropher Faktor ist das Fibronektin. Zuständig für die Chemo- und Haptotaktik der Zellen, könnte bei geringerer Konzentration von schlechterer Zellmotilität und -adhäsion ausgegangen werden. Die Adhäsion der Zellen aneinander und an dem Zelluntergrund ist ein wesentlicher Faktor für das Überleben der Zellen [19]. Bei geringer Fibronektinkonzentration könnte somit von höherer Zelltodwahrscheinlichkeit ausgegangen werden. Da Fibronektin im Serum bedeutend höher als im FW konzentriert ist, der Unterschied im Zelltodverhalten aber nur gering und statistisch nicht signifikant ist, konnte kein konzentrationsabhängiger Vorteil im Überleben der Zellen festgestellt werden. Gleiches gilt auch für die anderen Wachstumsfaktoren.

Zusammenfassend konnte in diesen Versuchen festgestellt werden, dass Serum und FW für sich genommen nicht toxisch auf die Zellen wirken [29],[10],[21],[62], sondern der Zelltod bei Inkubation mit beiden Substanzen am ehesten durch ein multifaktorielles Zusammenspiel der Inhaltsstoffe sowie Malnutrition bei Inkubation mit stark verdünnten Substanzen bedingt ist.

Nach Auswertung aller Experimente dieser vergleichenden Studie kann also gezeigt werden, dass Serum die Proliferation und die Migration der HCE- Zellen signifikant stärker fördert als Fruchtwasser. Beide Testsubstanzen zeigen keine toxischen Eigenschaften und sind daher als unbedenklich im Hinblick auf ihre Wirkung auf die HCE- Zellen einzustufen. Serum enthält von allen gemessenen Inhaltsstoffen signifikant höhere Konzentrationen als FW und bietet damit den HCE- Zellen die günstigeren epitheliotrophen Verhältnisse. Da FW ebenfalls Wachstumsfaktoren enthält, im Gegensatz zu isotoner Salzlösung, ist damit auch verständlich, dass FW im Vergleich mit isotoner Salzlösung zu signifikant besseren Ergebnissen in der Proliferations- und Migrationsförderung führt, wie die Experimente von Ashley Behrens zeigen.

Im direkten Vergleich mit dem schon klinisch eingesetzten Serum jedoch kann die proliferations- und migrationsfördernde Potenz vom FW als signifikant geringer eingeordnet werden. Weiterführende klinische Studien für die Verwendung von FW können daher aus unserer Sicht nicht empfohlen werden, da das schon verwendete Serum zu eindeutig besseren Ergebnissen in der Proliferation und Migration der HCE- Zellen führt.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Die Augenoberfläche wird durch den Tränenfilm benetzt, der zur Herstellung einer feuchten Gleitschicht für die Lider dient. Zusätzlich enthalten Tränen Stoffe, die der Immunabwehr dienen und die die Korneaepithelzellen zur Regeneration nach Verletzungen anregen (z.B. EGF und TGF- β). Bei trockenem Auge fehlt dieser Tränenfilm und es kommt zu Erosionen und Ulzerationen. In der Therapie des trockenen Auges werden daher Augentropfen unterschiedlichster Zusammensetzung eingesetzt. Mittlerweile sind diverse Augentropfen mit benetzenden Eigenschaften entwickelt worden. Da es aber nicht nur um die Benetzung der Augenoberfläche geht, sondern auch die Regenerationsfähigkeit der Korneaepithelzellen mit den AT unterstützt werden soll, wird intensiv an weiteren Medikamenten geforscht. So werden Augentropfen aus autologem Serum erfolgreich verwendet. Neuerdings ist auch Fruchtwasser als Tränenersatzmittel in der Diskussion. Fruchtwasser wurde schon in verschiedenen Studien mit bisher eingesetzten Lösungen verglichen, die zur Augenspülung genutzt werden, wie isotone Kochsalzlösung oder PBS, bisher aber noch nicht im direkten Vergleich zu Serum- AT. Unser Ziel war es daher, Serum- AT und FW-AT vergleichend an einem Zellkulturmodell hinsichtlich ihrer proliferations- und migrationsfördernden Potenz zu untersuchen.

Material und Methoden: Serum wurde von 10 gesunden Freiwilligen (mittleres Alter = 28 ± 6 Jahre) nach standardisiertem Protokoll entnommen und präpariert. Die FW- Proben (nicht mehr benötigter und sonst verworfener Überstand von routinemäßig zur humangenetischen Untersuchung eingesandter Proben) von 20 Schwangeren (mittleres Alter = 38 ± 2 Jahre) der 15. $\pm 1,3$ Schwangerschaftswoche wurde uns freundlichst durch das Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt. Die Serum- Proben lagerten bei -70°C , die FW- Aliquots lagerten bei -30°C . Für die Experimente wurden die Serum- und FW- Proben mit BSS auf die Konzentrationen unverdünnt, 50, 25, 12,5, 6,25 und 0 % verdünnt. Mit diesen Konzentrationen wurde ein ATP-Assay zur Proliferationsuntersuchung, ein Kolonie- Dispersions- Assay zur Untersuchung der Migration und ein Apoptose- und Nekrose- Assay zur Zelltoduntersuchung durchgeführt. Für diese drei Assays verwendeten wir die humane Hornhautepithelzelllinie RCB1384 als Zellkulturmodell. Desweiteren folgte die Analyse einiger Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- β , Fibronectin), der Vitamine A und E und weiterer

Inhaltsstoffe wie Glukose, Totalprotein und Albumin in den Testsubstanzen.

Ergebnisse: Von den gemessenen Inhaltsstoffen enthielt Serum signifikant höhere Konzentrationen ($p \leq 0,0001$) als FW. Beide Testsubstanzen wirkten auf die HCE- Zellen nicht toxisch. HCE- Zellen, die mit Serum inkubiert wurden, zeigten eine signifikant bessere Proliferation und Migration als mit FW inkubierte HCE- Zellen. Dabei gilt in beiden Assays, dass die Förderung der Proliferation beziehungsweise der Migration mit zunehmender Verdünnung der Testsubstanzen abnimmt. Die stärkste Proliferation der HCE- Zellen wurde nach Inkubation über 24 h mit unverdünntem Serum beobachtet (Signifikanz von $p \leq 0,032$ im Vergleich zur Inkubation mit FW unverdünnt). Bei dem Migrationsassay zeigte ebenfalls die Inkubation mit unverdünnten Serumproben die stärkste Potenz in der Migrationsförderung. Nach anfänglich ähnlichen Ergebnissen nach Inkubation mit FW und Serum über 24 und 48 h wurde der Unterschied in der Migrationsförderung beider Substanzen nach Inkubation über 96 h signifikant $p \leq 0,0001$. Die Ergebnisse der Zelltoduntersuchung zeigten dagegen keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Testsubstanzen.

Schlussfolgerung: Serum zeigte in diesen Experimenten wesentlich bessere proliferations- und migrationsfördernde Effekte auf Korneaepithelzellen als Fruchtwasser, bei gleichen Ergebnissen in den Apoptoseassays und Nekrosebestimmungen. Damit weist Serum, in Anbetracht der größeren Konzentrationen an Wachstumsfaktoren und nutritiven Inhaltsstoffen, eine höhere Effektivität in der Unterstützung der HCE- Zellen bei der Proliferation und Migration auf. FW zeigte gegenüber den Ergebnissen der Negativkontrollen ebenfalls einen proliferations- und migrationsfördernden Effekt, wie es von Ashley Behrens im Vergleich mit isotoner Salzlösung beschrieben wurde, blieb aber in der Wirkung signifikant hinter Serum zurück. Damit können weiterführende klinische Studien mit Fruchtwasser aus unserer Sicht nicht empfohlen werden, da mit Serum eine wesentlich potentere Substanz zur Behandlung von Korneaulzerationen zur Verfügung steht.

Literaturverzeichnis

- [1] Araki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al . Immortalization of Rabbit Corneal Epithelial Cells by a Recombinant SV40- Adenovirus Vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2665- 2667, 1993.
- [2] Araki-Sasaki K; Ohashi Y; Sasabe T; et al. An SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(3) 614-21, 1995.
- [3] Barton K, Nava A, Monroy DC. Cytokines and tear function in ocular surface disease. *Adv Exp Med Biol* 438: 461- 469, 1998.
- [4] Benjamin WJ, Hill RM. Human Tears: Osmotic Characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Scie Dec.1983(24): 1624-26*, 1983.
- [5] Bilgihan K, Adiguzel U, Sezer C. Effects of topical vitamin E on keratocyte apoptosis after traditional photorefractive keratectomy. *Ophthalmologica* 215: 192-196, 2001.
- [6] Brian A, Maldonado, Furcht LT. Epidermal Growth Factor Stimulates Integrin-Mediated Cell Migration of Cultured Human Corneal Epithelial Cells on Fibronectin and Arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(10): 2120- 2126, 1995.
- [7] Brian D, Bassi GM, Horwitz AR, Lauffenburger DA. Directional persistence of egf-induced cell migration is associated with stabilisation of lamellopodial protrusion. *biophysj* 88: 1479- 1488, 2005.
- [8] Brijacak N, Dekaris I, Gagro A, Gabrić N. Therapeutic effect of amniotic membrane in persistent epithelial defects and corneal ulcers in herpetic keratitis. *Coll Antropol. Oct 32(2): 21- 25*, 2008.
- [9] Campbell J, Wathen NC; Merryweather I, Abbott R. Concentrations of vitamins A and E in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid, and maternal serum in the first trimester of pregnancy. *Arch Dis Child* 71: F49- F50, 1994.

- [10] Castro-Combs J, Noguera G, Behrens A. Corneal wound healing is modulated by topical application of amniotic fluid in an ex vivo organ culture model. *j.exer.2008* 87: 56-63, 2008.
- [11] Collins MK, Perkins GR, RodriguezTarduchy G et al. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioassays* 16: 133- 138, 1994.
- [12] Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of atp bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160: 81-88, 1993.
- [13] de Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 23: 522- 525, 1940.
- [14] del Castillo JM, de la Casa Jm, Sanchez JG et al. Treatment of recurrent corneal erosions using autologous serum. *Cornea* 21: 781- 783, 2002.
- [15] Ebner S, You L, Völcker HE. Effekt von autologem Serum auf die Heilung nicht-infektiöser Hornhautulzera und Expression von Wachstumsfaktor- Rezeptoren in der Kornea. *Ophthalmologe* 98: 27, 2001.
- [16] Er H, Umez E. Effects of transforming growth factor-beta 2, interleukin 6 and fibronectin on corneal epithelial wound healing. *Eur J Ophthalmol* 8: 224- 229, 1998.
- [17] F. Grehn. *Augenheilkunde*. Springer Verlag Berlin, 2002.
- [18] Fox, RI; Chan, R; Mishelson. Beneficial effects of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 27: 459-461, 1984.
- [19] Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induce apoptosis. *J Cell Biol* 124: 619- 626, 1994.
- [20] Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MDP. Fibronectin in the Tear Film. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996 37(2): 459- 67, 1996.
- [21] Geerling, G., Daniels. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(5): 948-56, 2001.
- [22] Geerling G, Hartwig D. Autologe Serum- Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche. *Ophthalmologe* 2002; 99: 949- 959, 2002.

- [23] Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 1467- 1474, 2004.
- [24] Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J 2nd. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol.* 1978 Apr;96(4): 677-81, 1978.
- [25] Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 20: 807- 810, 2001.
- [26] Haber M, Cao Z, Panjwani N. Effects of growth factors (EGF, PDGF-BB, and TGF-beta 1) on cultured equine epithelial cells and keratinocytes: implication for wound healing. *Vet Ophthalmol* 6: 211- 217, 2003.
- [27] Hartwig D, Harloff S, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion* 2004; 44: 1724- 1731, 2004.
- [28] Herminghaus P, Geerling G, Hartwig D. Epitheliotrophe Kapazität von Serum- und Plasmaaugentropfen. *Ophthalmologe* 101: 998- 1005, 2004.
- [29] Herretes S, Behrens A, et al. Use of Topical Human Amniotic Fluid in the Treatment of Acute Ocular Alkali Injuries in Mice. *AJO* 2006 142(2): 271- 78, 2006.
- [30] Carney LG Hill RM. The closed eye environment: pH. *Am J Ophthalmol* May;94(5): 821 - 824, 1976.
- [31] Hofmann GE, Abramowicz JS. Epidermal growth factor (EGF) concentrations in amniotic fluid and maternal urine during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 69(3): 217- 221, 1990.
- [32] Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 19: 113. 129, 2000.
- [33] Inman WH, Colowick SP. Stimulation of glucose uptake by transforming growth factor β : Evidence for the requirement of epidermal growth factor-receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci* 82: 1346- 1349, 1985.
- [34] Jauniaux E, Gulbis B, Hyett J. Biochemical analyses of mesenchymal fluid in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 178: 765- 769, 1998.
- [35] Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D. Relationship between protein concentrations in embryological fluids and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy. *Hum Reprod* 9: 161- 166, 1994.

- [36] Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B. Investigation of the acid-base balance of coelomic and amniotic fluids in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 170: 1365- 1369, 1994.
- [37] Jumblatt MM and Neufeld AH . $\tilde{A}$ - Adrenergic and Serotonergic Responsiveness of Rabbit Corneal Epithelial Cells in Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1139-1143, 1983.
- [38] Kanski JJ, Spitznas M. *Lehrbuch der klinischen Ophtalmologie*. Thieme Verlag Stuttgart, 1987.
- [39] Kay EP, Lee MS, Seong GJ. TGF-beta stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res* 17: 286- 293, 1998.
- [40] Kim KS, Oh JS, Kim IS. Clinical efficacy of topical homologous fibronectin in persistent corneal epithelial disorders. *Korean J Ophthalmol* 6: 12-18, 1992.
- [41] Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K et al. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1773- 1778, 1990.
- [42] Klósek A, Hirnle L, Siut J et al. Fibronectin level in amniotic fluid as an index of unavoidable labor. *Gynekol Pol* 71(4): 298- 303, 2000.
- [43] Lang, Gerhard K. *Augenheilkunde*. Thieme Verlag Stuttgart, 2004.
- [44] Lee HS, Kim JC. Effect of amniotic fluid in corneal sensitivity and nerve regeneration after excimer laser ablation. *Cornea* 15: 517- 524, 1996.
- [45] Lin S, Sahai A, Chugh SS, Pan XP, Wallner EI, Danesh FR, Omasney JW, Kanwar YS. High glucose stimulates synthesis of fibronectin via a novel protein kinase c, rap1b, and b-raf signaling pathway. *JJournal of Biological Chemistry* 277(44): 41725- 41735, 2002.
- [46] Linus Pauling Institute at the Oregan University. Vitamin a. <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminA>, 01.
- [47] Liu L. *Development of a New Lubricant and Nutrient Tear Substitute*. Universitaet zu Luebeck, 2004.
- [48] Liu L, Hartwig D, Harloff S. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243: 706- 714, 2005.

- [49] Lung-Kun Yeh, Wei-Li Chen, Wei Li, Edgar M. Espana, Jie Ouyang, Tetsuya Kawakita, Winston W.-Y. Kao, Scheffer C.G. Tseng and Chia-Yang Liu. Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(2): 479- 486, 2005.
- [50] Mishima H, Nakamura M, Murakami J, Nishida T, Otori T. Transforming growth factor-beta modulates effects of epidermal growth factor on corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 11(7): 691- 696, 1992.
- [51] Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799- 1805, 1994.
- [52] Morrison PR, Edsall JT, Miller SG. Preparation and properties of serum and plasma proteins XVIII. The separation of purified fibronectin from fraction I of human plasma. *J Am Chem Soc* 70: 3130, 1948.
- [53] Breslin CW Motolko M. The effect of pH and osmolarity on the ability of tolerate artificial tears. *Am J Ophthalmol Jun; 91(6): 781 - 784*, 1981.
- [54] Nishida T, Nakagawa S, Awata T. Rapid preparation of purified autologous fibronectin eyedrops from patients plasma. *Jpn J Ophthalmol* 26: 416, 1982.
- [55] Nishida T, Nakagawa S, Awata T. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *J Cell Biol* 97: 1653, 1983.
- [56] Nishida T, Ohashi Y, Awata T. Fibronectin: A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 101: 1046, 1983.
- [57] Ogawa Y, Okamoto S, Mori T. Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 31: 579- 583, 2003.
- [58] Oliveira FR, Barros EG, Magalhães JA. Biochemical profile of amniotic fluid for the assessment of fetal and renal development. *Braz J Med Biol Res* 35(2): 215- 222, 2002.
- [59] Pastor JC, Calonge M. Epidermal growth factor and corneal wound healing: a multicenter study. *Cornea* 11: 311- 314, 1992.
- [60] Pfister RR, Burstein N. The effects of ophthalmic drugs, vehicles and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15(4): 246- 259, 1976.

- [61] Phan TM, Foster CS, Boruchoff SA. Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol* 104: 494, 1987.
- [62] Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 85(10): 1188- 1197, 2002.
- [63] Breslin CW Raber I. Toleration of artificial tears - the effect of pH. *Can J Ophthalmol* Oct;13(4): 247 - 249, 1978.
- [64] Rao RC, Varani J, Soong HK. FGF promotes corneal stromal fibroblast motility. *J Ocul Pharmacol* 8: 77- 81, 1992.
- [65] Reuter P. *Springer Lexikon Medizin*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York S. 1760, 2004.
- [66] Rocha EM, Pelegrino FS, de Paiva CS. GVHD dry eyes treated with autologous serum tears. *Bone Marrow Transplant* 25: 1101- 1103, 2000.
- [67] Rodeck U, Jost M, Kari C. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 110: 113- 121, 1997.
- [68] Rohrbach JM, Steuhl KP, Knorr M. *Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Wundheilung*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 2002.
- [69] Ross MG, Brace RA. National Institute of Child Health and Development Conference summary: amniotic fluid–basic and clinical aspects. *J Matern Fetal Med* 10: 2- 19, 2001.
- [70] Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG. Comparative studies on amniotic fluid and plasma fibronectins. *Biochem J* 193: 295-299, 1981.
- [71] Scardovi C, De Felice GP, Gazzaniga A. Epidermal growth factor in the topical treatment of traumatic corneal ulcers. *Ophthalmologica* 206: 119- 124, 1993.
- [72] Schiebeler TH, Schmidt W. *Anatomie*. Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2003.
- [73] Schmidt-Matthiesen H, Wallwiener D. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Schattauer Verlag Stuttgart New York, 2005.
- [74] Sharif NA, Wiernas TK, Howe WE. Human Corneal Epithelial Cell Functional Responses to Inflammatory Agents and Their Antagonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2562- 2571, 1998.

- [75] Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochem Biophys Acta* 1072: 1- 7, 1991.
- [76] Spiegelman AV, Deutsch TA, Sugar J. Application of homologous fibronectin to persistent human corneal epithelial defects. *Cornea* 6: 128- 130, 1987.
- [77] Stefos T, Sotiriadis A, Kaponis A, Dalkalitsis N, Lolos D. Amniotic fluid glucose at the time of genetic amniocentesis: correlation with duration of pregnancy and birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 106(2): 144- 147, 2003.
- [78] Stegner, HE. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1996.
- [79] Tanaka Y, Matsubara H, Mori Y, Kosaki A, Kishimoto N, Amano K, Higashiyama S, Iwasaka T. Involvement of hb-egf and egf receptor transactivation in tgf-b-mediated fibronectin expression in mesangial cells. *Kidney International* 62: 799-808, 2002.
- [80] Thomas L. *Labor und Diagnose*. Dade Behring Verlag, Frankfurt/Main, 2005.
- [81] Tisi DK, Emard JJ, Koski KG. Total Protein Concentration in Human Amniotic Fluid Is Negatively Associated with Infant Birth Weight. *J Nutr* 134: 1754- 1758, 2004.
- [82] Tsubota K, Goto E, Fujita H. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 83: 390- 395, 1999.
- [83] Tsubota K, Goto E, Shimmura S et al. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 106: 1984- 1989, 1999.
- [84] Tsubota K, Satake Y, Shimazaki J et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 122: 38- 52, 1996.
- [85] Ubels JL, Iorfino A, O'Brien WJ. Retinoid acid decreases the number of EGF receptors in corneal epithelium and Chang conjunctival cells. *Exp Eye Res* 52: 49-53, 1991.
- [86] Watanabe K, Nakagawa S, Nishida T. Chemotactic and haptotactic activities of fibronectin for cultured rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 572- 577, 1988.
- [87] White E. Review: Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Gen Dev* 10: 1- 15, 1996.

- [88] Cronin MT Worth AP. The use of pH measurements to predict the potential of chemicals to cause acute dermal and ocular toxicity. *Toxicology Dec;169(2): 119 - 131*, 2001.
- [89] Gilvarry AM Wright P, Cooper M. Effect of osmolarity of artificial tear drops on relief of dry eye symptoms: BJ6 and beyond. *Br J Ophthalmol 71: 161 - 164*, 1987.
- [90] Zhang Q, Shimoya K, Murata Y et al. Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid. *Mol Hum Reprod 7: 573- 579*, 2001.
- [91] Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AEK, Dalbone AC. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 1346- 1355*, 2000.

6 Tabellen

6.1 Übersicht zu den Messergebnissen

Analyt	Mittelwert	SEM	Analyt	Mittelwert	SEM
S 100 %	66,82	13,9 *,+,°	FW 100 %	30,92	3,99 ‘,°
S 50 %	65,78	15,6 *,+	FW 50 %	29,38	7,10 ‘
S 25 %	56,32	12,88 +	FW 25 %	27,72	6,46 ‘
S 12,5 %	47,84	6,52 *,+,°	FW 12,5 %	21,67	4,54 ‘,°
S 6,25 %	28,36	5,52 +,°	FW 6,25 %	7,23	3,15 ‘,°
S 0 %	5,98	2,29	FW 0 %	4,06	1,50

Tabelle 6.1: Proliferation nach Inkubation über 6h. SEM = Standardfehler; * = signifikante Unterschiede zwischen Serum 100 %, 50 % und 12,5 % zu Serum der Konzentration von 6,25 % ($p \leq 0,04$); += signifikante Unterschiede zum Serum der Konzentration von 0 % ($p \leq 0,001$), ‘ = signifikante Unterschiede zum FW der Konzentrationen von 6,25 % und 0 % ($p \leq 0,02$), ° = Signifikanz zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen ($p \leq 0,03$)

Analyt	Mittelwert	SEM	Analyt	Mittelwert	SEM
S 100 %	79,15	19,19 *,+,°	FW 100 %	8,42	2,16 ‘,°
S 50 %	32,00	9,09 *,+,°	FW 50 %	6,85	2,44 ‘,°
S 25 %	18,52	7,95 +	FW 25 %	2,93	1,65
S 12,5 %	15,98	3,63 *,+,°	FW 12,5 %	0,34	0,28 °
S 6,25 %	22,08	0,86 +,°	FW 6,25 %	0,16	0,11 °
S 0 %	0,36	0,23	FW 0 %	0,12	0,11

Tabelle 6.2: Proliferation nach Inkubation über 24h. SEM = Standardfehler; * = signifikante Unterschiede zwischen Serum 100 %, 50 % und 12,5 % zu Serum der Konzentration von 6,25 % ($p \leq 0,04$); += signifikante Unterschiede zum Serum der Konzentration von 0 % ($p \leq 0,04$), ‘ = signifikante Unterschiede zum FW der Konzentrationen von 12,5 %, 6,25 % und 0 % ($p \leq 0,003$), ° = Signifikanz zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen ($p \leq 0,03$)

Analyt	Mittelwert	SEM	Analyt	Mittelwert	SEM
S 100 %	73,19	21,19 *, [°]	FW 100 %	7,29	2,51 [°]
S 50 %	64,93	21,73 *, [°]	FW 50 %	4,85	1,46 [°]
S 25 %	57,68	16,98 *, [°]	FW 25 %	5,02	3,30 [°]
S 12,5 %	34,07	11,30 *, [°]	FW 12,5 %	0	/a
S 6,25 %	4,87	1,00 [°]	FW 6,25 %	0	/a
S 0 %	0	/a	FW 0 %	0	/a

Tabelle 6.3: Proliferation nach Inkubation über 48h. SEM = Standardfehler; /a Berechnung nicht möglich; * = signifikante Unterschiede zum Serum der Konzentration von 6,25 % ($p \leq 0,01$); [°] = Signifikanz zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen ($p \leq 0,01$)

Analyt	Mittelwert	SEM
Nullpunkt	90160	2355
S 25 %	94069	4593 *,
S 50 %	109458	4674 ‘, [°]
S 100 %	103178	3690 ‘,
FW 50 %	97864	2840 ‘, [°]
FW 100 %	100807	6927 *,

Tabelle 6.4: Migration nach Inkubation über 24h. SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen sowie zum Nullpunkt; ‘ = signifikanter Unterschied zum Nullpunkt ($p \leq 0,05$); [°] = Signifikanz zwischen beiden Substanzen ($p \leq 0,05$)

Analyt	Mittelwert	SEM
Nullpunkt	90160	2355
S 25 %	109283	5229 *
S 50 %	123070	7281 *,‘
S 100 %	134476	8919 *,‘
FW 50 %	105384	6451 *,‘
FW 100 %	130903	8354 *

Tabelle 6.5: Migration nach Inkubation über 48h. SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen; ‘ = signifikanter Unterschied zum Nullpunkt (FW $p \leq 0,05$, Serum $p \leq 0,005$)

Analyt	Mittelwert	SEM
Nullpunkt	90160	2355
S 25 %	113908	2368 *
S 50 %	144214	5945 ‘, °
S 100 %	190393	7701 ‘, °
FW 50 %	97805	4069 ‘
FW 100 %	127454	9910 *

Tabelle 6.6: Migration nach Inkubation über 96h. SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen und zum Nullpunkt; ‘= signifikanter Unterschied zum Nullpunkt (FW $p \leq 0,05$, Serum $p \leq 0,005$), ° = Signifikanz zwischen beiden Substanzen ($p \leq 0,0001$)

Analyt	Mittelwert (U)	SEM
S 100 %	0,86	0,24 *
S 50 %	0,57	0,11 *
S 6,25 %	0,81	0,16 *
FW 100 %	0,79	0,24 *
FW 50 %	0,71	0,15 *
FW 6,25 %	0,43	0,12 *

Tabelle 6.7: Apoptose- Messung nach 24h, SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen

Analyt	Mittelwert (U)	SEM
S 100 %	0,27	0,05 *
S 50 %	0,25	0,03 °
S 6,25 %	0,79	0,13 *
FW 100 %	0,24	0,06 *
FW 50 %	0,47	0,09 °
FW 6,25 %	1,08	0,77 *

Tabelle 6.8: Apoptose- Messung nach 48h, SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen, ° = Signifikanz $p \leq 0,03$

Analyt	Mittelwert (U)	Analyt	Mittelwert (U)
S_{24h} 100 %	0,27 °	S_{48h} 100 %	0,86 °
S_{24h} 50 %	0,25 °	S_{48h} 50 %	0,57 °
S_{24h} 6,25 %	0,79 *	S_{48h} 6,25 %	0,81 *
FW_{24h} 100 %	0,24 °	FW_{48h} 100 %	0,79 °
FW_{24h} 50 %	0,47 *	FW_{48h} 50 %	0,71 *
FW_{24h} 6,25 %	1,08 *	FW_{48h} 6,25 %	0,43 *

Tabelle 6.9: Apoptose- Messung nach 24 und 48h, SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeiten 24 und 48h gleicher Testsubstanzkonzentration, ° = signifikante Unterschiede zwischen den Zeiten 24 und 48h gleicher Substanzkonzentration ($p \leq 0,03$)

Analyt	Mittelwert U/l	SEM
S 100 %	1,89	1,05 *
S 50 %	0,0001	0,0001 °
S 6,25 %	0,52	0,52 °
FW 100 %	2,8	1,18 *
FW 50 %	2,6	0,88 °
FW 6,25 %	4,36	0,77 °

Tabelle 6.10: LDH- Messung nach 24h, SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen, ° = Signifikanz $p \leq 0,01$

Analyt	Mittelwert U/l	SEM
S 100 %	6,13	2,62 *
S 50 %	1	1 *
S 6,25 %	1,68	0,82 °
FW 100 %	3,6	1,42 *
FW 50 %	3,25	1,24 *
FW 6,25 %	6,36	1,01 °

Tabelle 6.11: LDH- Messung nach 48h, SEM = Standardfehler; * = keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Substanzen gleicher Konzentrationen, ° = Signifikanz $p \leq 0,002$

6.2 Übersicht zu den Reagenzien und Materialien

Artikel	Bestellnummer	Firma	Firmensitz
Pipetten 5 ml	159625	Nunc	Wiesbaden- Schierstein, Deutschland
Pipetten 10 ml	159633		
Cryo Tubes	377272		
Nunc F96 Platten	236105		
White Microwell SI 96F Nontreated	236105		
Nunclon Surface 6 Well	140675		
Röhrchen 15 ml	188271	Greiner Bio One	Greiner Bio-One GmbH, Stuttgart, Deutschland
Tissue Culture Flasks 250 ml	658175		
Flexiperm Micro 12	90011436		
Röhrchen 50 ml	62547254	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Microtube 1,5 ml	72692005		
Safe Seal Tipps 1000 μ l	691000	Biozym scientific	Hess. Oldendorf, Deutschland
Safe Seal Tipps 100 μ l	692066		
96er Zellkulturplatten	35-3072	Fulcon	Plymouth, UK
Reagenzreservoir	703459	Brand	Wertheim, Deutschland
Stericup GP Filter Unit 500 ml	SCGPU05RE	Millipore	Millipore Cooperation, Billerica, MA

Tabelle 6.12: Materialien

Artikel	Bestellnummer	Firma	Firmensitz
HAM's Medium F12	N 4888	Sigma- Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Insulin	I 1882		
EGF 0,1mg	E 4127		
BAC	B 6295		
Kollagen Typ VII	C 8897		
Albumin bovine serum Frakt. V	A 9414	Sigma- Aldrich	
HEPES	H 3375/25G		
Choleratoxin 0,1 µg/ml	C 8052		
DMSO Hybri max	D 2650		
MEM Medium	3260-02G	Gibco	Gibco, Grand Island NY, USA
Penicillin/ Streptomycin	15140-122		
FBS	10108-165		
PBS	10010-015		
Trypsin EDTA	L 2143	Biochrom AG	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	11774425001	Roche Applied Science	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
BSA	735086		
ATPlite	6016947	Perkin Elmer	Massachusetts, USA
Quantikine EGF ELISA	DEG 00	R & D	R & D Systems, Massachusetts, USA
Quantikine TGF-β ELISA	DB 100B		
Human Fibronectin ELISA	BMS 2028	Bender MedSystems	Bender MedSystems, Wien, Österreich
BSS		Bausch und Lomb	Incorporated, Waterford, Irland
Haematoxylin	101922	MP Biomedicals	Biomedicals Germany, Heidelberg, Deutschland
Hydroxyurea 1g	102023		
Cutasept F		Bode Chemie	Hamburg, Deutschland

Tabelle 6.13: Chemikalien

Gerät	Hersteller
Osmometer Fiske Modell 2400 Multisampler	Fiske Associated; Advance Instruments, Norwood; USA
pH- Meter WTW pH530	WTW GmbH, 8120 Weilheim; Deutschland
Aeroset	Abbott, 1230 Wien; Österreich
Labgard 425, Laminar- Flow- Sicherheitswerkbank KLASSE II	Nuaire, Plymouth, MN 55447 USA
CO ₂ Water- Jacketed Incubator	Nuaire, Plymouth, MN 55447; USA
Hettich Rotixa AP-4202	Hettich GmbH & Co.KG, 78532 Tuttlingen; Deutschland
Multi- Tube- Vortexer	OPS Diagnostics, LLC, NJ; USA
ELISA- / Luminescence- Reader Tecan Infinite 200	Tecan Deutschland GmbH 74564 Crailsheim; Deutschland
Columbus Pro Washer	Tecan Deutschland GmbH 74564 Crailsheim; Deutschland

Tabelle 6.14: Geräte

7 Danksagung

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet. Ich danke euch von ganzem Herzen für die Liebe und die Unterstützung, die ihr mir schenkt.

Meinem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Hartwig, Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, danke ich für die zeitintensive Betreuung der Arbeit und seine ständige Unterstützung. Unsere Zusammenarbeit war stets ausgezeichnet, effektiv und durch intensiven Austausch gekennzeichnet und basierte auf einem freundschaftlichen Verhältnis, herzlichen Dank dafür.

Prof. Dr. med. G. Geerling danke ich für die interessante Themenstellung und die Herstellung des Kontaktes zu meinem Doktorvater. Für die Betreuung meines Vortrages zur und während der DOG 2008 in Berlin bin ich sehr dankbar.

Ich danke Prof. Dr. med. M. Seyfarth, Leiter des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck, für die Bereitstellung des Laborraumes und die freundlichen Arbeitsbedingungen. Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck, für die hilfsbereite Unterstützung meiner Arbeit, insbesondere für die Messung der Konzentrationen der Vitamine A und E.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. Gillesseon- Kaesbach, Leiterin des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, für die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung der Fruchtwasserproben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gilt auch Dr. med. K. Kasper für die Unterweisung im Umgang mit der Zellkultur und den Versuchsabläufen, Dipl.- Inf. J. Keiner für die Unterstützung bei der computergesteuerten Auswertung der Migrationsassays, Sonja Muthorst und meinem Bruder Marko für die Unterstützung bei der Niederschrift.

Dank gilt allen freiwilligen Probanden für die Ermöglichung dieser Arbeit.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Birgit Frank
Anschrift: Kalkbrennerstraße 18
23562 Lübeck
Deutschland
Geburtsdatum: 26.03.1984
Geburtsort: Staaken
Familienstand: ledig

Schulbildung

1990 - 1996 Grundschohle in Falkensee
1996 - 2003 Lise- Meitner- Gymnasium Falkensee

Hochschulbildung

2003 - 2005 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Abschluss: 1. Staatsexamen nach neuer ÄAppO
2005 - 2009 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Abschluss: 2. Staatsexamen nach neuer ÄAppO

Famulaturen

02/ 2006 Allgemein- und Visceralchirurgie, Sana- Kliniken Lübeck; Deutschland
03/ 2006 Anästhesie, Havelland Klinik, Nauen; Deutschland
07- 08/ 2006 Gastroenterologie/ Nephrologie/ Hepatologie, St. Johannsspital, Salzburg; Österreich
09/ 2007 RadiologieViscérale, Centre Hospitalier E.Muller, Mulhouse; Frankreich
10/ 2007 Allgemein- und Unfallchirurgie- Praxis, Falkensee; Deutschland
02/ 2008 Urologie, UK- SH Lübeck; Deutschland
03/ 2008 Augenheilkunde, UK- SH Lübeck; Deutschland

Praktisches Jahr

- 18.08.- 07.12.2008 1.Tertial: Innere Medizin, Sana- Kliniken Ostholstein Eutin;
Deutschland
- 08.12.- 27.03.2009 2.Tertial: Chirurgie, DRK- Krankenhaus Mölln-Ratzeburg;
Deutschland
- 28.03.- 17.07.2009 3.Tertial: Radiologie, Kantonsspital Schaffhausen; Schweiz

Veröffentlichungen

- 05/ 2008 Poster auf dem Doktorandentag der Universität zu Lübeck
Titel: Serum- Augentropfen versus Fruchtwasser- Augentropfen
zur Behandlung von Augenoberflächenerkrankungen
– Eine in- vitro- Studie –
- 19.09.2008 Vortrag auf der DOG 2008 in Berlin
Vortragsnummer: FR.17.07,
Sitzung: Kornea: Diagnostik und Therapie
Titel: Serum- Augentropfen versus Fruchtwasser- Augentropfen
zur Behandlung von Augenoberflächenerkrankungen
– Eine in- vitro- Studie –