Vergleichende *in vitro* und *in vivo* Studie von Pigmentepithelzellen und Biomaterialien zur Entwicklung eines Transplantates im subretinalen Raum

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin Anna-Katharina Salz

aus Bendorf (Rhein)

Berichter:	Universitätsprofessorin	Dr. med. Gabriele Thumann
	Universitätsprofessor	Dr. rer. nat. Lothar Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **v**

Abkürzungsverzeichnis **vii**

1 Einleitung **1**
1.1 Das menschliche Auge . . . 1
1.1.1 Anatomie der Konjunktiva . . . 3
1.1.2 Immunprivileg des subretinalen Raumes . . . 3
1.2 Retinales Pigmentepithel . . . 3
1.2.1 Ontogenese des retinalen Pigmentepithels . . . 4
1.2.2 Aufgaben und Funktionen des retinalen Pigmentepithels . . . 5
1.3 Altersbedingte Veränderungen des gesunden RPE-Choroidea-Komplexes 6
1.4 Altersabhängige Makuladegeneration . . . 7
1.4.1 Ursachen und Pathogenese . . . 7
1.4.2 Therapieformen der AMD . . . 8
1.4.3 Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen . . . 9
1.4.4 Irispigmentepithel Zellen als Alternative zu RPE Zellen . . . 10
1.5 *Tissue Engineering* . . . 10
1.5.1 Trägermaterialien für Pigmentepithel Zellverbände . . . 12
1.6 Potentielle Trägermaterialien . . . 13
1.7 *In vitro* Kulturen und das Tiermodell . . . 14
1.8 Zielsetzung der Arbeit und Vorgehensweise . . . 15

2 Material und Methoden **17**
2.1 Materialien . . . 17
2.1.1 Biomaterialien . . . 17
2.1.2 Chemikalien . . . 18
2.1.3 Verbrauchsmaterialien . . . 19
2.1.4 Geräte . . . 20
2.1.5 Medien, –zusätze und Lösungen sowie ihre Zusammensetzung . . 21
2.1.6 Vital- und weitere Farbstoffe . . . 22
2.1.7 Antikörper . . . 22
2.1.8 RNA Isolation / PCR . . . 22
2.1.9 *Primer* . . . 23
2.1.10 Zellkulturen und Tiermodell . . . 23
2.1.11 *In vivo* Transplantation . . . 24
2.1.12 *Software* . . . 24

2.2 Methoden . . . 25
2.2.1 Vorbereitung der Biomaterialien . . . 25
2.2.1.1 DTAF Färbung von Biomaterialien . . . 25
2.2.2 Rasterelektronenmikroskopie . . . 26
2.2.3 Beurteilung der Hydrophilie der Materialien . . . 26
2.2.4 Bestimmung der Diffusion durch Biomaterialien . . . 26
2.2.4.1 Photometrie . . . 27
2.2.4.2 Diffusionsprozesse und das 1. Fick'sche Gesetz . . . 27
2.2.4.3 Berechnung des Diffusionskoeffizienten . . . 29
2.2.4.4 Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten . . . 30
2.2.4.5 Diffusionsmessung durch Biomaterialien und native Gewebe . . . 30
2.2.4.6 Dickenmessung der Materialien . . . 33
2.2.5 ARPE-19 Zellkultur . . . 33
2.2.6 Präparation boviner RPE und IPE Zellen . . . 34
2.2.7 Zellzahlbestimmung zur definierten Aussaat . . . 35
2.2.8 Markierung von Zellen . . . 36
2.2.8.1 PKH26 Färbung der Zellmembran . . . 36
2.2.8.2 Hoechst 33342 Färbung der Zellkerne . . . 36
2.2.9 Vitalfärbung . . . 37
2.2.10 TER Messung . . . 37
2.2.11 Immunfluoreszenz von Zellkulturen . . . 38
2.2.11.1 Fixierung von Zellkulturen . . . 38
2.2.11.2 Färbeprotokoll . . . 39
2.2.12 Herstellung von Gefrierschnitten . . . 39
2.2.13 Genexpressionsanalyse . . . 40
2.2.13.1 Gesamt-RNA Isolation . . . 40
2.2.13.2 Bestimmung von Nukleinsäure Konzentrationen . . . 40
2.2.13.3 *Reverse Transkription* Polymerase Kettenreaktion . . . 41
2.2.13.4 Quantitative *Real-Time* Polymerase Kettenreaktion . . . 41
2.2.14 *In vivo* Transplantation am Kaninchenauge . . . 43
2.2.14.1 Subkonjunktivale Transplantation . . . 43
2.2.14.2 Subretinale Transplantation . . . 44
2.2.15 Histologische Aufarbeitung der Kaninchenaugen . . . 44
2.2.15.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung . . . 45
2.2.16 Evaluierung subkonjunktival transplantierter Biomaterialien . . . 46

3 Ergebnisse **49**
3.1 Materialeigenschaften . . . 49
3.1.1 Oberflächenstrukturen der Biomaterialien . . . 49
3.1.2 Benetzbarkeit der Materialoberflächen . . . 51
3.1.3 Permeabilitätseigenschaft der Biomaterialien . . . 52
3.1.4 Heterogene Eigenschaften zwischen Fertigungsauflagen der Biomaterialien . . . 55
3.2 Vitalfarbstoff PKH26 . . . 56
3.2.1 Darstellung von ARPE-19 Zellen durch die PKH26 Färbung . . . 56
3.2.2 PKH26 Färbung von Primärzellen zur Detektion . . . 57
3.2.3 Kryoschnitte PKH26 markierter Zellen . . . 59
3.2.3.1 Kryoschnitte von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien . 59

3.2.3.2 Kryoschnitte von Primärzellen auf Materialien 59
3.3 Zellkultur von RPE und IPE Zellen auf Biomaterialien 61
3.3.1 Zellwachstum des bovinen RPEs auf Biomaterialien 61
3.3.2 Zellwachstum des bovinen IPEs auf Biomaterialien 64
3.3.3 Vitalität von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien 66
3.3.4 Vitalität boviner RPE Zellen auf Biomaterialien 68
3.3.5 Vitalität boviner IPE Zellen auf Biomaterialien 70
3.4 Immunhistologie von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien 72
3.5 Widerstandsmessung (TER) von ARPE-19 Zell*sheets* 74
3.6 Genexpressionsanalyse von primären RPE und IPE Zellen 76
3.6.1 Zellkulturen für die RNA Isolation 76
3.6.2 Präzisionskontrollen im *LightCycler* 80
3.6.3 *Crossing Points* und Datenanalyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR 82
3.6.4 Quantifizierung der Genexpression von bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien 85
3.7 Subkonjunktivale Transplantation in das Kaninchenauge 90
3.7.1 Klinische Verlaufskontrollen 90
3.7.1.1 equine Kollagenmembran 91
3.7.1.2 humane Amnionmembran 91
3.7.1.3 Seidenmembran 91
3.7.1.4 Poly-L-Lactid Vliese 93
3.7.1.5 Zusammenfassung der klinischen Beobachtungen 93
3.7.2 Histologische Evaluierung der Biokompatibilität von Biomaterialien nach subkonjunktivaler Transplantation 93
3.7.2.1 Entzündungszellen 94
3.7.2.2 Degradation der Materialien 98
3.7.2.3 Ersatzgewebebildung und Gewebestruktur im Transplantationsareal 102
3.7.2.4 Zusammenfassung der Bioverträglichkeit 105
3.8 Subretinale Transplantation von Kollagen- und Amnionmembranen . . . 105

4 Diskussion **109**
4.1 Materialeigenschaften 109
4.2 Biomaterialien sind geeignete Substrate für das Zellwachstum 111
4.3 Barriereeigenschaften von ARPE-19 Zell*sheets* 115
4.4 Biomaterialien begünstigen eine RPE charakteristische Expression . . . 117
4.5 Biokompatibilität der Materialien *in vivo* 121
4.5.1 Klinische Kontrollen subkonjunktival transplantierter Biomaterialien 121
4.5.2 Histologische Evaluierung der Biomaterialien 121
4.5.3 Schlussfolgerung 124
4.5.4 Biomaterialien werden im subretinalen Raum toleriert 125
4.6 Zusammenfassung und Ausblick 126

Abbildungsverzeichnis **129**

Tabellenverzeichnis **131**

A Originale Messdaten **133**
A.1 Hydrophilie der Materialoberflächen 133
A.2 Diffusionsmessungen 134
A.2.1 Eichwerte zur Erstellung der Regressionsgeraden 134
A.2.2 Dickenmessung der Materialien 135
A.3 Widerstandsmessungen (TER) 136
A.4 *LightCycler* CP Werte 137
A.4.1 Referenzgen HPRT1 137
A.4.2 Zielgene 140
A.5 Histologische Evaluierung nach subkonjunktivaler Transplantation . . . 148
A.5.1 Kollagen 148
A.5.2 Amnion 151
A.5.3 Seide 154
A.5.4 PLLA 157

Literaturverzeichnis **161**

Veröffentlichungen **175**
A.5.5 Publikationen aus Inhalten der vorliegenden Arbeit 175
A.5.6 Publikationen im Rahmen der wissenschaftlichen Tätigkeit . . . 175
A.5.7 Poster 175
A.5.8 Vorträge 176

Lebenslauf **177**

Danksagung **179**

Zusammenfassung

Ein Therapieansatz der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) ist die Transplantation von Pigmentepithelzellen in den subretinalen Raum. Dort sollen die Zellen degenerierte retinale Pigmentepithelzellen (RPE) ersetzen und die normale Anatomie im subretinalen Raum rekonstruieren, indem sie die funktionelle Verbindung zu den Photorezeptoren und die Blut-Retina-Schranke wiederherstellen. Verschiedene experimentelle und klinische Studien zeigen jedoch, dass Zellsuspensionen nach Transplantation keine Monoschicht im subretinalen Raum bilden.

Zur Optimierung des Transplantationserfolges ist die präoperative Etablierung einer organisierten Zellmonoschicht mit Hilfe von Trägermaterialien wesentlich. Dieser Ansatz des *Tissue Engineering* bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit. RPE Zellen und die embryogenetisch verwandten Irispigmentepithel Zellen (IPE) werden in Kultur auf abbaubaren Biomaterialien expandiert, bis sie einen einschichtigen Zellverband mit natürlicher Polarität ausbilden. Das Konstrukt aus Zellen und dem Substrat kann schließlich Einsatz in der subretinalen Transplantation finden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse von vier verschiedenen Biomaterialien hinsichtlich ihrer Eignung als Trägermaterial für RPE bzw. IPE Zellen. Diese ultradünnen Membranen bestehen aus equinem Kollagen Typ I, humaner Amnionmembran, Seide und elektrogesponnenen Nanofaser-Vliesen aus Poly-L-Lactid (PLLA).

Die Eigenschaften der nativen Materialien, wie ihre Oberflächenbeschaffenheit und Permeabilität, werden anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Diffusionsmessungen analysiert. Anschließend werden sowohl RPE Zellen einer humanen Zelllinie als auch primäre bovine RPE und IPE Zellen auf den Biomaterialien kultiviert und ihre Morphologie, Proliferation und Vitalität untersucht. Quantitative Analysen auf der Genexpressionsebene sowie qualitative Nachweise der Proteinexpression geben Aufschluss über den Differenzierungsstatus der Zellen auf den verschiedenen Substraten. Die Funktion der Zellverbände wird anhand von Widerstandsmessungen überprüft.

Während der subkonjunktivalen Transplantation in das Kaninchenauge kann die Handhabbarkeit der Materialien beurteilt werden. Nach der Implantation ermöglicht die klinische Nachsorge sowie die histologische Aufarbeitung der Gewebe die Evaluierung der Verträglichkeit und Degradation der Biomaterialien.

In Kultur adhärieren sowohl RPE als auch IPE Zellen auf allen Materialien und bilden Monoschichten aus. Die beste Vitalität und differenzierte Morphologie der Zellen zeigt sich dabei auf equinem Kollagen und humanem Amnion. Abhängig vom Substrat zeigen die Pigmentepithelzellen Unterschiede in ihrer Expression von epithelialen bzw. RPE charakteristischen Genen und Enzymen. Der differenzierte Status wird insgesamt auf Kollagen und Amnion am besten erhalten. IPE Zellen exprimieren ebenfalls RPE charakteristische Gene und verstärken die Expression auf den Materialien teilweise mehr als RPE Zellen. Auf Kollagen, Amnion und Seide bilden RPE Zellen dichte Verbände, die als Barriere ähnlich der Blut-Retina-Schranke fungieren.

Nach einer subretinalen Transplantation muss das Biomaterial eine Diffusion zwischen Choroidea und Retina gewährleisten. Das dreidimensionale Maschenwerk der Nanofasern erlaubt eine Diffusion ähnlich der nativen Gewebekomplexe aus Bruch'scher Membran und Choroidea. Die folienartigen Membranen aus Kollagen, Amnion und Seide lassen sich dagegen in Kultur und während der Transplantation leichter handhaben.

Aufgrund der freitragenden Eigenschaften aller untersuchten Biomaterialien ist im Rahmen der *in vivo* Studie eine subkonjunktivale Transplantation möglich. Entscheidend für einen zukünftigen Einsatz am Patienten sind die Bioverträglichkeit sowie die Abbaucharakteristika der verwendeten Materialien. Die Quantifizierung von inflammatorischen Zellen im Implantationsareal verdeutlicht eine sehr gute Biokompatibilität der Kollagen- und Amnionmembranen. Die Seidenmembranen hingegen verursachen eine deutliche akute Entzündung, die sich im mittleren Verlauf verstärkt und sich im Langzeitverlauf in einer milden Entzündungsreaktion manifestiert. PLLA Faservliese lösen die stärkste akute Inflammation aus und führen während der Degradation des Materials nach etwa drei Monaten zu einer chronischen granulomatösen Entzündung. Der Abbau der vier Materialien nach subkonjunktivaler Implantation erfolgt innerhalb von 10 bis 16 Wochen.

Kollagen- und Amnionmembranen werden infolge ihrer guten Bioverträglichkeit und der positiven Ergebnisse der *in vitro* Studien zur Evaluierung der subretinalen Transplantation ausgewählt. Die chirurgische Implantation ist ohne Komplikationen durchführbar und beide Materialien fügen sich in die Anatomie des subretinalen Raumes ein. Innerhalb der Nachbeobachtungszeit von neun Monaten degradieren beide Materialien nicht vollständig; sie werden aber über diesen Zeitraum ohne eine Abstoßungsreaktion toleriert.

Schlussfolgernd sind die biologischen Materialien equines Kollagen und humanes Amnion als Träger für Pigmentepithelzellen und für die Transplantation in den subretinalen Raum geeignet.

Abkürzungsverzeichnis

Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit verwendet:

ad	bis
A/D	analog/digital
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
b	bovin
bzw.	beziehungsweise
BM	Bruch'sche Membran
BM-CH	Bruch'sche Membran-Choroidea
BPB	Bromphenolblau
bRPE	bovines RPE
BSA	bovines Serumalbumin
cd	candela (Lumineszenzintensität)
CathD	Cathepsin D
CD86	*Cluster of Differentiation* 86
cDNA	*copy*DNA
cm	Zentimeter
CNV	choroidale Neovaskularisation
CP	*Crossing Point*
CRALBP	*Cellular retinaldehyde-binding protein*
CT	*Cycle Threshold*
d	Tag
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dichlorid
dest.	destilliert
DIZG	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluoreszein
et al.	*et alteri*
EDTA	Ethylendinitrotetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Rinderserum
FDA	Fluoreszeindiacetat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

GCL	Ganglienzellschicht
ggf.	gegebenenfalls
°C	Grad Celsius
h	human
H_2O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
Hz	Hertz
INL	innere nukleäre Schicht
IPE	Irispigmentepithel
KRT8	Keratin 8
l	Liter
mol/l	Mol pro Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
mRNA	*messenger* RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol/l	Mikromol pro Liter
NFL	Nervenfaserschicht
nm	Nanometer
NTC	*no template control* (Negativkontrolle)
ONL	äußere nukleäre Schicht
OT	Objektträger
p	porcin
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEDF	*Pigment epithelium-derived factor*
PFA	Paraformaldehyd
PFCL	Perfluorcarbon
pH	*pons hydrogenium*
PI	Propidiumiodid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PLLA	Poly-L-Lactid
PGS	Polyglycerolsebacat
PDMS	Polydimethylsiloxan
POE	Polyorthoester
poly-LacNAc	poly-N-Acetyllactosamin
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPE65	*Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein*
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription

RT-PCR	*Real Time* PCR
s	Sekunde
sog.	sogenannt
TER	Transepithelialer Widerstand
TGFβ	*Transforming growth factor* β
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vgl.	vergleiche
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
VUCCD	*Visual Ussing Doubletracking CCD-Photometer*
wt.%	Gewichtsprozent
ZO-1	*Zonula occludens*-1
α	anti
Δ	Delta
λ	Wellenlänge
Ω	Widerstand
Ωcm^2	Flächenwiderstand
∂	partieller Differentialoperator

Kapitel 1

Einleitung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine langsam fortschreitende, degenerative Netzhauterkrankung, bei der das Sehzentrum betroffen ist. Die pathologischen Prozesse der AMD erstrecken sich über den Gewebekomplex aus neurosensorischer Retina, retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran und Choroidea. Verschiedene chirurgische Therapieansätze erreichten bisher keine oder nur eine geringe Visusverbesserung für die Patienten.

Daher ist die Rekonstruktion dieses funktionellen Komplexes in den Fokus der Forschung gerückt. Ein Konzept ist die Transplantation von Pigmentepithel Zellverbänden in den subretinalen Raum. Hierfür ist ein Trägermaterial erforderlich, das ein Zellwachstum und die Implantation des Zellverbandes ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Biomateralien hinsichtlich ihrer Eignung als Wachstumssubstrat und Zellträger für Pigmentepithelzellen untersucht.

Zum besseren Verständnis der altersabhängigen und degenerativen Prozesse werden im Folgenden zunächst Grundlagen zum Aufbau und der Physiologie des Auges bzw. des retinalen Pigmentepithels beschrieben. Anschließend wird das Konzept des *Tissue Engineering* für eine intraokuläre Anwendung dargestellt.

1.1 Das menschliche Auge

Im Längsschnitt wird der Aufbau des Auges deutlich (Abbildung 1.1). Das Auge lässt sich in den Vorderabschnitt und den Hinterabschnitt aufteilen. Durch den Vorderabschnitt, bestehend aus der Cornea (Hornhaut), der Iris (Regenbogenhaut) mit Pupille und der Linse, wird eintretendes Licht gebrochen. Anschließend fällt es durch den transparenten Corpus vitreum (Glaskörper) fokussiert auf die im Hinterabschnitt des Auges liegende Retina (Netzhaut). Diese besteht aus mehreren diskreten Schichten (Abbildung 1.2). Von innen nach außen fällt Licht zunächst auf die Nervenfaserschicht (NFL), die aus Axonen der Ganglienzellen besteht und sich im Bereich der Papille zum Nervus opticus (Sehnerv) vereinen. Darunter liegt die Ganglienzellschicht (CGL), gefolgt von der inneren plexiformen Schicht (IPL). Hier werden synaptische Kontakte von Ganglienzellen zu Amakrin- und Bipolarzellen geknüpft. Die innere nukleäre Schicht (INL) besteht aus den Zellkörpern dieser beiden Zelltypen und Horizontalzellen. Über die äußere plexiforme Schicht (OPL) sind Horizontalzellen schließlich mit den Photorezeptoren verbunden, welche die äußere nukleäre Schicht (ONL) bilden. Ihre Photorezeptoraußensegmente absorbieren das Licht und beginnen die Signaltransduktionskaskade des visuellen Zyklus. In engem funktionellen Kontakt zu den Photorezeptoren steht das darunter liegende retinale Pigmentepithel [Campbell, 1998].

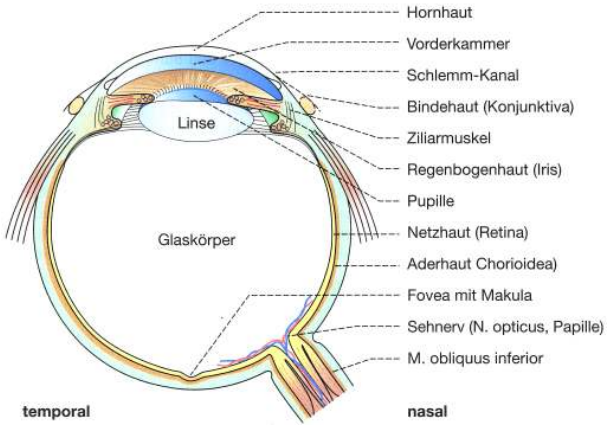


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des menschlichen Auges. Abbildung aus [Böcker, 2008].

Am hinteren Pol der Retina liegt die Makula. Sie ist der Bereich mit der höchsten Dichte an Photorezeptoren und verantwortlich für fokussiertes Sehen. Das schärfste Sehen ist in der Fovea centralis möglich, ein kleines Areal in der Makula, das ausschließlich Zapfen enthält. Dieses Areal wird zum Beispiel beim Lesen oder der Gesichtserkennung angeregt.

Die Blutversorgung der inneren Netzhautschichten, von den Nervenfasern bis zu der inneren Körnerschicht, erfolgt durch die Arteria- und Vena centralis retinae, die entlang des Sehnervs verlaufen. Die Gefäße bilden auf der nicht-myelinisierten Nervenfaserschicht ein feines Geflecht um die Makula mit einer Aussparung im Bereich der Fovea [Grehn, 2008]. Aufgrund der Vaskularisation über große Flächen der Netzhaut wird diese als holangiotisch bezeichnet.

Die äußeren Schichten der Retina werden über das Kapillargeflecht aus fenestriertem Endothel der Choroidea (Aderhaut), die sog. Choriokapillaris, versorgt, die unterhalb der Bruch'schen Membran beginnt [Weiter and Ernest, 1974]. Neben einer starken Vaskularisation zeichnet sich das Gewebe der Choroidea auch durch Pigmenteinlagerungen aus.

Nach außen hin wird der Bulbus (Augapfel) von einem harten weißen Bindegewebe, der Sklera (Lederhaut) umgeben, die sich an die Choroidea anschließt. Die Konjunktiva (Bindehaut) säumt wiederum die Sklera ein und kleidet den Raum zwischen den Augenlidern, dem Bulbus und der Orbita (Augenhöhle) aus.

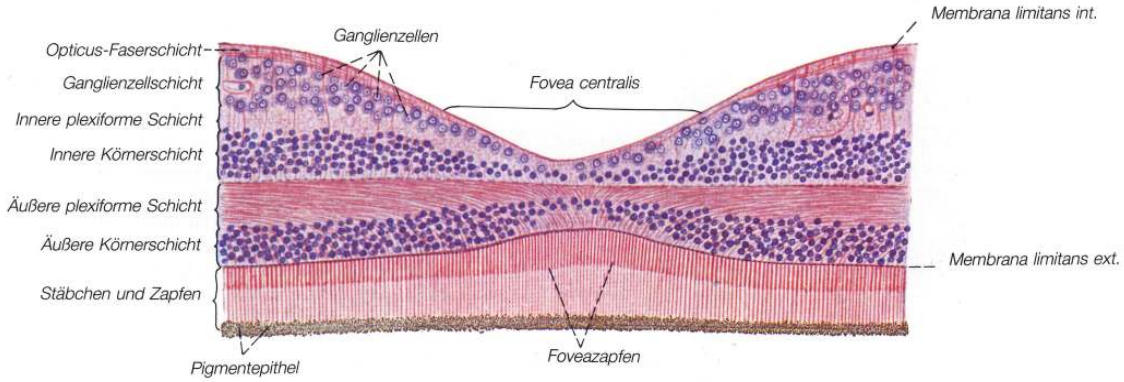


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau der Netzhautschichtung. Abbildung aus [Welsch, 2005].

1.1.1 Anatomie der Konjunktiva

Die Konjunktiva ist eine transparente, muköse Membran, welche die vordere Oberfläche der Sklera bis an den Rand der Cornea und die innere Oberfläche der Lider bedeckt [Lloyd *et al.*, 2001]. Sie besteht aus einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel und dem konjunktivalen Stroma. Dieses unterteilt sich in eine Drüsenschicht und eine fibröse Schicht [Lee *et al.*, 2003], welche beide aus lockerem Bindegewebe mit Abwehrzellen, Mastzellen und vielen Blutgefäßen bestehen [Lloyd *et al.*, 2001]. Die Konjunktiva besitzt die Fähigkeit zur spontanen Wundheilung. Diese beinhaltet die Reepithelialisierung, Wundkontraktion und schließlich die Formation einer subkonjunktivalen fibrösen Narbe. Letztere entsteht durch die Migration und Proliferation von Fibroblasten und durch die Synthese bzw. den Umbau von Kollagenfaserbündeln im Wundbett [Hsu *et al.*, 2000], [Lee *et al.*, 2003].

1.1.2 Immunprivileg des subretinalen Raumes

Das Auge als Teil des Nervensystems zählt zu den immunologisch privilegierten Bereichen des Körpers [Jiang *et al.*, 1993], [Wenkel and Streilein, 1998]. Das bedeutet, dass allogene und xenogene Transplantate im Auge länger überleben als an anderen, nicht privilegierten Körperstellen [Halberstadt and Emerich, 2006], [Jiang *et al.*, 1993]. Das Immunprivileg bezieht sich neben dem Vorderabschnitt auch auf den Hinterabschnitt des Auges. Im subretinalen Raum zwischen RPE Zellen und Photorezeptorzellen wird das Immunprivileg unter anderem durch das Fehlen von lymphatischen Drainagewegen sowie durch das RPE vermittelt [Zamiri *et al.*, 2007]. Denn RPE Zellen verhindern ein willkürliches Eindringen von Zellen oder Molekülen aus dem Blut der Choriokapillaris in den subretinalen Spalt [Streilein, 2003]. Des Weiteren sezernieren sie immunsuppressive Zytokine wie beispielsweise *Transforming growth factor* β [Jiang *et al.*, 1993]. Zellen der Retina exprimieren Membranmoleküle wie FasL, die an der Beseitigung von inflammatorischen Zellen beteiligt sind [Niederkorn, 2003].

Das retinale Pigmentepithel selbst kann zudem als ein immunologisch privilegiertes Gewebe betrachtet werden, denn ein verlängertes Überleben ohne Anzeichen einer Inflammation nach extraokulärer Transplantation ist experimentell belegt [Wenkel and Streilein, 2000].

1.2 Retinales Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel ist ein einschichtiger Verband pigmentierter Zellen, der an der äußeren Seite der Retina in direktem Kontakt zu den Photorezeptoren steht. Diese Verbindung wird nur durch einen aktiven Wasser- und Elektrolyttransport der RPE Zellen aus dem subretinalen Spalt aufrechterhalten. Eine feste Bindung besteht ausschließlich am Sehnerv und im Bereich der *ora serrata*, dem Übergang zwischen dem lichtempfindlichen Teil der Netzhaut und dem blinden Anteil, der den Ziliarkörper überzieht. In Aufsicht zeichnet sich das RPE durch eine regelmäßige hexagonale bis polygonale Form der Zellen aus, welche in der Literatur häufig als Kopfsteinpflaster Morphologie beschrieben wird [Marmor and Wolfensberger, 1998].

Das RPE ist ein spezialisiertes Epithel, welches essentielle Funktionen im subretinalen Raum ausführt. An diese Funktionen angepasst ist auch der Aufbau der Zellen, der eine für Epithelzellen typische Polarität aufweist (Abbildung 1.3). Die apikale Membran ist durch zahlreiche Mikrovilli gekennzeichnet, die die äußeren Segmente der Photorezeptoren umschließen. Darunter liegen in der apikalen Zone Bündel von Aktinfilamenten, welche die Zelle wie ein Gürtel an der Membran entlang umgeben (in der Abb. als *Centrosome* benannt). Sie sind unter anderem Anknüpfpunkt für Intermediärfilamente mit ihren verschiedenen Klassen an Cytokeratinen. Diese erstrecken sich in die gesamte Zelle und bilden zusammen mit weiteren Aktinfilamenten, Mikrotubuli und

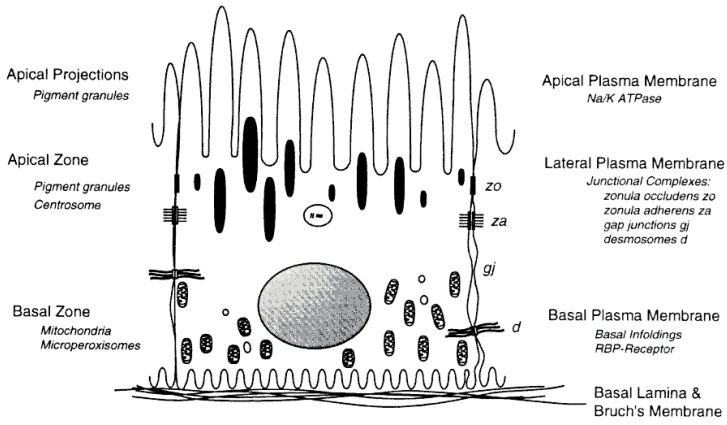


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau einer retinalen Pigmentepithelzelle mit ihrer charakteristischen Polarität und asymmetrischen Anordnung der Organellen. Abbildung aus [Marmor and Wolfensberger, 1998].

anderen Komponenten das Zellskelett, welches für Struktur und intrazellulären Transport der RPE Zellen verantwortlich ist.

Ebenfalls in Kontakt mit den Aktinbündeln stehen Komplexe, die benachbarte Zellen miteinander verbinden. Diese sog. *zonula adherens* und im Besonderen die *tight junctions* bilden einen wasserdichten Kontakt, der charakteristisch für RPE Zellen ist. Im Zytoplasma der apikalen Zone kommen außerdem zahlreiche Pigmentgranula vor und verleihen den Zellen ihre dunkle Erscheinung. In der basalen Zone der Zellen ordnen sich die meisten Organellen und der Zellkern an. Auf der basalen Seite ist die Zellmembran ebenfalls eingestülpt und liegt auf der Basalmembran, der sogenannten Bruch'schen Membran auf. Unterhalb der Bruch'schen Membran schließt sich die Choroidea mit ihrem Kapillargeflecht an. Da dieses Gewebe die Nährstoffe für die außen liegenden Anteile der Retina transportiert, ist das retinale Pigmentepithel der Vermittler zwischen Choriokapillaris und Netzhaut.

1.2.1 Ontogenese des retinalen Pigmentepithels

Obwohl das RPE mit der neurosensorischen Retina histologisch nicht verwächst, bilden sie eine enge funktionelle Einheit aus. Dies wird bereits während der Entstehung beider Gewebe deutlich. Die embryonale Entwicklung des RPE findet in gegenseitiger Abhängigkeit und Interaktion mit der Photorezeptorentwicklung statt. In verschiedenen Stadien beeinflussen sich die Gewebe der zukünftigen Netzhaut und des RPEs wechselseitig durch die Expression von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren und verschiedenen Enzymen des retinalen Metabolismus [Strauss, 2005].

Aus einer Einstülpung des Neuralrohres im Bereich des späteren Mittelhirns bildet sich zunächst der doppelschichtige Augenbecher. Aus dessen innerem Blatt entwickelt sich die spätere neurosensorische Retina, aus dem äußeren Anteil das retinale Pigmentepithel. Ontogenetisch sind beide Gewebe folglich neuroektodermalen Ursprungs [Gilbert, 2000].

Eine wichtige Station der Differenzierung in RPE Zellen ist die Entwicklung der Bruch'schen Membran. Diese bildet sich zu einer fünfschichtigen Struktur von 2-4 µm Dicke aus, bestehend aus der Basalmembran der RPE Zellen, einer inneren Kollagenfaserschicht, einer Schicht aus elastischen Fasern, der äußeren Kollagenfaserschicht und der Basalmembran der Choroidea [Priore *et al.*, 2006]. Des Weiteren entfalten RPE Zellen ihre Polarität und vergößern mittels Mikrovilli die apikale Oberfläche um das dreifache im Vergleich zur basalen Zellmembran. Im Anschluss daran entwickelt sich der junktionale Komplex und die Pigmenteinlagerung in den

Zellen beginnt [Strauss, 2005].

Parallel entwickeln sich aus Neuroblasten im inneren Teil des Augenbechers die verschiedenen neuronalen Zelltypen der Netzhaut und ordnen sich in den charakteristischen drei nukleären Schichten an. Nach dieser grundlegenden Entwicklung werden Photorezeptoren und RPE Zellen ausdifferenziert und bilden eine funktionelle Einheit, welche die Aufgaben und Physiologie der RPE Zellen begründet.

1.2.2 Aufgaben und Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Retinale Pigmentepithelzellen spielen eine kritische Rolle für die Funktion und Integrität der Photorezeptoren. Sie transportieren Nährstoffe von den Blutgefäßen der Choroidea zu den Neuronen und nehmen ihre Abfallprodukte auf. Zu den Abfallprodukten zählen die Membranscheiben der äußeren Segmente der Photorezeptoren, welche von den RPE Zellen phagozytiert werden [Dunn *et al.*, 1996], [Lee *et al.*, 2006], [Martínez-Morales *et al.*, 2004]. Aufgrund der starken Lichtexposition reichern sich in den äußeren Segmenten hohe Konzentrationen von Radikalen und geschädigten Proteinen bzw. Lipiden an, so dass täglich von der Basis der Segmente neue Disks gebildet werden und die verbrauchten Membranscheiben am apikalen Ende an die RPE Zellen abgeschieden werden. In den Lysosomen der RPE Zellen werden die Disks mittels Proteasen wie Cathepsin D verdaut und wichtige Moleküle wie Retinal an die Photorezeptoren zurückgegeben. In der Literatur finden sich Angaben, dass 20-45 Photorezeptoren von einer RPE Zelle versorgt werden [Lee *et al.*, 2006], [Strauss, 2005]. Der Prozess der Phagozytose scheint allein durch das Vorhandensein von Disks initiiert zu werden, ohne dass eine Substanz die Kommunikation zwischen beiden Zelltypen vermittelt [Strauss, 2005].

In wechselseitigem Austausch von Molekülen zwischen Photorezeptor und RPE Zelle findet auch der visuelle Zyklus statt. Die Lichtabsorption des Rhodopsins in den Photorezeptoren führt zu einer Konformationsänderung des gebundenen Retinals von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, welche im Rezeptorpotential und der anschließenden Weiterleitung der sensorische Erregung in der Retina resultiert. Inaktiviertes Rhodopsin gibt das all-trans-Retinal ab, welches in den Photorezeptoren zu all-trans-Retinol verstoffwechselt und zu den RPE Zellen transportiert wird. Mittels verschiedener Enzyme isomerisieren die RPE Zellen dieses zurück zu 11-cis-Retinal und stellen es den Photorezeptoren erneut zur Verfügung [Campbell, 1998]. Zwei Enzyme in diesem komplexen Prozess sind das *Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein* (RPE65) und das *Cellular retinaldehyde-binding protein* (CRALBP).

RPE65 liegt in einer membrangebundenen und einer löslichen Form in RPE Zellen vor und ist essentiell für die Produktion von 11-cis-Retinal [Redmond *et al.*, 1998]. Das Enzym fungiert als Chaperon und Bindeprotein für Retinylester und ist der geschwindigkeitsbestimmende Faktor im visuellen Zyklus [Strauss, 2005]. CRALBP bindet das 11-cis-Retinol, damit es von einer Dehydrogenase zu 11-cis Retinal oxidiert werden kann [Saari *et al.*, 2001], [Thumann *et al.*, 1999b]. Beide Enzyme gelten als Marker für differenzierte und funktionelle RPE Zellen.

Eine weitere Funktion, die mit dem Lichteinfall auf die Retina in Zusammenhang steht, ist die Absorption von Streulicht durch das retinale Pigmentepithel. Die Melaninproduktion im RPE wird je nach Lokalisation der Zellen unter der Makula oder der Netzhautperipherie angepasst, um die Lichtabsorption möglichst effizient zu gestalten. Dass Zellen in der Makula dunkler erscheinen als in der Peripherie, liegt aber auch an der höheren RPE Zelldichte in dieser Region. Die Zellen sind hier schmaler und höher als in der Peripherie, so dass der Prozentsatz der Pigmentgranula pro Zelle sich nicht zwingend unterscheidet [Marmor and Wolfensberger, 1998], [Strauss, 2005].

Um den reaktiven Sauerstoffspezies entgegenzuwirken, die durch den Lichteinfall aber auch durch die Phagozytoseleistung des RPEs in großer Menge entstehen, bilden RPE Zellen auch

Antioxidantien wie Lutein und Karotinoide und besitzen darüber hinaus Reparaturmechanismen für geschädigte DNA, Lipide und Proteine.

Im apikalen Bereich unterhalb der Mikrovilli besitzen RPE Zellen *tight junctions*. Diese Komplexe bestehen aus Proteinen wie *Zonula occludens*-1 (ZO-1), Occludin und Claudin und verbinden benachbarte Zellen derart miteinander, dass sie eine parazelluläre Diffusion von Molekülen verhindern [Schneeberger and Lynch, 2004]. Aufgrund von spezialisierten Transportern wie z.B. die Na^+K^+-ATPase oder Glukosetransporter in der apikalen Membran und Ionenkanälen in der basalen Membran, wird ein selektiver Transport durch die RPE Zellen möglich. Zusammen mit der Bruch'schen Membran bildet das RPE so die Blut-Retina-Schranke aus, die auch eine immunologische Barriere darstellt [Marmor and Wolfensberger, 1998], [Strauss, 2005].

Dass retinale Pigmentepithelzellen auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, zeigt ihre Expression von Antigenen wie CD86, die üblicherweise mit Monozyten assoziiert werden. Diese Expression ist mit dem Prinzip der Phagozytose verknüpft, in dem RPE Zellen den Prozess des Erkennens, der Adhäsion und Aufnahme von Partikeln ähnlich zu Makrophagen ausführen. Auf Monozyten und Makrophagen ist CD86 ein weitverbreitetes kostimulatorisches Antigen [Kanuga *et al.*, 2002]. Hier dient es nach Kontakt der Zelle mit einem Fremdkörper zur Stimulation von T-Lymphozyten, die wiederum die Kaskade der erworbenen Immunabwehr fortführen. Für RPE Zellen wird daher angenommen, dass sie ebenfalls spezialisierte ansässige makrophagenähnliche Zellen der Blut-Retina-Schranke darstellen [Elner *et al.*, 1992].

Des Weiteren sezernieren RPE Zellen eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Zytokinen und deren Rezeptoren. In auto- und parakrinen Mechanismen werden Proliferation und Überleben des RPEs bzw. der retinalen Neurone und Gliazellen gefördert und reguliert [Kociok *et al.*, 1998]. Zu den Wachstumsfaktoren zählt auch der *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF). Dieser nimmt zum einen eine neuroprotektive Funktion für die Neurone der Retina wahr, zum anderen hat er einen anti-angiogenen Effekt, der eine Proliferation von Endothelzellen verhindert. Da RPE Zellen PEDF in die Interphotorezeptormatrix sezernieren, gleichzeitig aber auch den pro-angiogenen Faktor *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) hauptsächlich in Richtung der Choroidea sezernieren, halten sie die Choriokapillaris in einem stabilen Gleichgewicht [Barnstable and Tombran-Tink, 2004], [Strauss, 2005].

1.3 Altersbedingte Veränderungen des gesunden RPE-Choroidea-Komplexes

Im Alter unterliegt der Komplex aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea deutlichen Veränderungen. Die hohe Lichtexposition und der dauerhaft bestehende oxidative Stress wirken sich negativ auf die subretinalen Strukturen aus. Die Zellmembranen der RPE Zellen und Photorezeptoren bestehen zu 50% aus ungesättigten Fettsäuren wie Docosahexaensäure (DHA) und sind daher das Ziel für Lipidperoxidation. Ablagerungen von Endprodukten, aber auch von Lipiden, Fettsäuren und Proteinen aus dem RPE in der Basallamina führen mit zunehmendem Alter zu einer Dickenzunahme der Bruch'schen Membran [Booij *et al.*, 2010], [Moore and Clover, 2001].

Eine reduzierte enzymatische Aktivität in den Lysosomen führt zur Ansammlung eines weiteren Endprodukts aus dem Abbau der Photorezeptoraußensegmente, des sog. Lipofuszin [Feeney, 1978]. Außerdem finden Veränderungen der Kollagenfibrillen in der äußeren und inneren elastischen Schicht der Bruch'schen Membran statt und die pentalaminäre Struktur deformiert zusehens [Karwatowski *et al.*, 1995].

Dies führt zu einer verminderten Kapazität für den Transport von Wasser und Nährstoffen durch die Bruch'sche Membran mit zunehmendem Alter [Hussain *et al.*, 2010].

Zusätzlich nimmt die Gesamtdicke der Choroidea und der Durchmesser der einzelnen Ka-

pillaren ab. Aufgrund der schlechten Versorgungssituation steigt die Anzahl apoptotischer Zellen mit dem Alter vor allem im Makulabereich an [Priore *et al.*, 2002].

1.4 Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine der Hauptursachen für Visusminderung und Erblindung in der Bevölkerung der Industrienationen ab einem Alter von 50 Jahren [Chen *et al.*, 2009b], [Jager *et al.*, 2008], [Pascolini *et al.*, 2004]. Sie ist eine fortschreitende Erkrankung, die die Retina im Zentrum des schärfsten Sehens, der Makula, und den darunter liegenden Verbund aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea betrifft. Die Prävalenz steigt mit dem Alter deutlich an, so dass aufgrund der demographischen Entwicklung der Bevölkerung zum Beispiel in den USA mit einem Anstieg an AMD Erkankungen um 50% bis zum Jahr 2020 gerechnet wird [Friedman *et al.*, 2004]. Gerade die Einschränkung des fokussierten Sehens durch die AMD, die sich in Verminderung der Lesefähigkeit, Fahrtüchtigkeit oder Gesichtserkennung ausdrückt (Abbildung 1.4), verursacht starke emotionale Belastungen für den Betroffenen [Bok, 2005].



Abbildung 1.4: Zunehmener zentraler Gesichtsfeldausfall mit fortschreitender altersabhängiger Makuladegeneration (A-C). Die Abbildung wurde dem Internetauftritt von Pro Retina Deutschland e.V. (http://www.pro-retina.de) entnommen.

1.4.1 Ursachen und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der AMD sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Es zeigt sich aber, dass diese Erkrankung durch multifaktorielle Prozesse hervorgerufen wird, in denen externe Umwelteinflüsse und eine genetische Komponente zusammenwirken.

Als gesicherte externe Umwelteinflüsse bzw. Risikofaktoren gelten Nikotinabusus und intensive Lichtexposition in Kombination mit einem niedrigen Blutspiegel an Antioxidantien [Fletcher *et al.*, 2008], [Smith *et al.*, 2001], [Tomany *et al.*, 2004]. Eine starke Korrelation der Entwicklung einer AMD und einer positiven Familienanamnese verdeutlicht die Beteiligung einer genetischen Komponente. Es konnten bereits mehrere Polymorphismen bzw. Mutationen im Komplementsystem nachgewiesen werden, die zu einer genetischen Prädisposition und dem Krankheitsgeschehen beitragen [Edwards *et al.*, 2005], [Haines *et al.*, 2005], [Klein *et al.*, 2005].

Das erste klinische Kennzeichen ist das Auftreten von sog. Drusen, fokalen Ablagerungen unterhalb der RPE Zellen und in der Bruch'schen Membran [Marmor and Wolfensberger, 1998]. Obwohl solche Ablagerungen auch im Alterungsprozess von gesunden Augen auftreten (vgl. Kapitel 1.3), führen sie bei übermäßigem Vorkommen zu einer Schädigung des RPEs. Die Netzhaut verändert sich im Alter ebenfalls und enthält zum Beispiel mehr Eisen. Liegt dieses im

Überschuss vor, generiert es Hydroxylradikale, die wiederum Lipidmembranen und Proteine schädigen [Chen *et al.*, 2009b].

Schlussendlich ist anzunehmen, dass pathologische Stimuli über die Lebenszeit die RPE Zellen zu abnormalem zellulären Verhalten bringen, welches schließlich in der Atrophie der Zelle endet [Lee *et al.*, 2006].

Es gibt deutliche Hinweise auf eine Verbindung von Lipofuszin-Überbelastung und geographischer Atrophie [Holz *et al.*, 2001], [Marmor and Wolfensberger, 1998], [Schmitz-Valckenberg *et al.*, 2006]. Ein Schneeballeffekt aus oxidativem Stress ist für die Ausdehnung der Degeneration denkbar. Sterben erste RPE Zellen, sind die verbliebenen Zellen noch mehr Sauerstoffradikalen ausgesetzt, so dass diese aufgrund der Zusatzbelastung ebenfalls degenerieren [Strauss, 2005].

Erreicht die Degeneration der RPE Zellen im späteren Verlauf der AMD eine bestimmte Größe, wird dies als geographische Atrophie bezeichnet. Diese geht einher mit dem Untergang der Photorezeptoren und der Choriokapillaris im betroffenen Areal. Da diese Atrophie erst im späten Verlauf im Sehzentrum liegt, ist sie zu einem hohen Anteil an moderatem Visusverlust beteiligt. Diese Form wird auch als “trockene” AMD bezeichnet [Sunness *et al.*, 1999] und kennzeichnet sich durch verminderte Kontrastschärfe und eingeschränktes Dämmerungssehen in einem langsamen und unauffälligen Verlauf über Monate bis Jahre [Binder *et al.*, 2007], [Jager *et al.*, 2008].

Charakteristisch für die sog. “feuchte”, exsudative AMD ist zusätzlich das Einsprossen von Blutgefäßen durch die Bruch'sche Membran und das geschädigte RPE in die Retina. Folgeerscheinungen sind Ansammlungen von Flüssigkeit unterhalb der Retina, Lipidablagerungen und Bildung von subfovealen Membranen oder die Abhebung des RPEs. Aufgrund der erhöhten Permeabilität der Gefäße kann die choroidale Neovaskularisation (CNV) zu subretinalen Blutungen führen, welche als Sekundärkomplikation in einem plötzlichen und starken Visusverlust resultieren [Ferris *et al.*, 1984], [Jager *et al.*, 2008].

1.4.2 Therapieformen der AMD

Da der Pathomechanismus der AMD noch nicht im Detail aufgeklärt ist, sind kausale Therapien bisher nicht möglich. Sowohl Klinik als auch Forschung fokussieren sich daher auf symptomatische Therapien bzw. die anatomische und damit funktionelle Rekonstruktion des geschädigten submakulären Raumes.

Für die geographische RPE Atrophie sind die Therapiemöglichkeiten limitiert. Ein aussichtsreicher Ansatz ist jedoch die prophylaktische Nahrungsergänzung mit Antioxidantien und Zink oder die Einnahme cholesterinsenkender Medikamente [Dreyhaupt *et al.*, 2007]. Die Gabe von Omega-3-Fettsäuren und Antioxidantien erzielte in einer Studie eine Verbesserung der Sehschärfe bei der Mehrzahl der Patienten [Cangemi, 2007]. Wie eine weitere Studie schildert, ist eine Langzeitgabe hochdosierter Vitamine jedoch kritisch zu beurteilen [Group, 2001].

Als etablierte Behandlungsmöglichkeit der exsudativen Form galt die thermale Photokoagulation mittels Laser, um die neuen Blutgefäße der CNV zu veröden [Priore *et al.*, 2006]. Bedingt durch die Zerstörung der Retina im Bereich der Laserbehandlung führte dies jedoch zu Gesichtsfeldausfällen (Skotome) bei den Patienten [Tezel *et al.*, 1996]. Durch Fortschritte in den letzten Jahren wurden weitere Methoden wie die photodynamische Therapie mit Verteporfin verfügbar. Dieser photosensitive Farbstoff wird intravenös injiziert und der Bereich der Neovaskularisation mit einem Laser bestrahlt. Über eine nicht-thermische Reaktion werden so die Gefäße verschlossen. Diese Methode reduziert zwar den Visusverlust, bewirkt aber keine Verbesserung der Sehschärfe [Jager *et al.*, 2008], [Priore *et al.*, 2006].

Die derzeit erfolgreichste Behandlung der feuchten AMD ist die intravitreale Injektion von VEGF Antagonisten, welche den pro-angiogenen Wachstumsfaktor und damit die Neovaskula-

risation hemmen. Mittels Injektionen von Antikörperfragmenten gegen VEGF in den Glaskörper konnte der Sehverlust aufgehalten und eine Verbesserung der Sehschärfe erzielt werden [Costa *et al.*, 2006], [Rosenfeld *et al.*, 2006]. Der Nachteil dieser Methode sind die multiplen Injektionen in regelmäßigen Abständen von Wochen oder Monaten, die nicht nur das Infektions- und Komplikationsrisiko erhöhen, sondern auch verstärkt logistische Anforderungen an den Patienten und die Klinik stellen [Kandula *et al.*, 2010]. Durch die wiederkehrenden Applikation ist diese Behandlung zudem sehr kostenintensiv [Jager *et al.*, 2008].

Chirurgische Methoden wie die Entfernung der subfovealen CNV Membranen sind technisch machbar [Thomas *et al.*, 1992]. Da diese Behandlung in der Mehrzahl der Fälle jedoch eher eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs und Rezidive der Neovaskularisation bewirkte, wird sie seit der Verfügbarkeit der anti-VEGF Therapie nur noch bei subretinalen Massenblutungen angewendet [Hawkins *et al.*, 2004], [Scheider *et al.*, 1999].

VEGF Injektionen wiederum sind nur dann wirksam, wenn RPE Zellen und Photorezeptoren noch nicht degeneriert sind. Um auch bei fortgeschrittener AMD die Sehschärfe zu verbessern, ist es daher unabdingbar, die normale subretinale Architektur wiederherzustellen.

Eine solche Rekonstruktion der Anatomie der Makula und der subretinalen Strukturen beschreibt die "*Maculoplasty*", die auf verschiedene Konzepte aufbaut [Priore *et al.*, 2006], [Tezel *et al.*, 2004].

Bei der von Machemer und Steinhorst entwickelten Methode der Translokation wird die Retina vollständig abgelöst und mit dem Sehnervenkopf als Drehpunkt rotiert, so dass die Fovea auf einem morphologisch intakten RPE der Peripherie zu liegen kommt [Machemer and Steinhorst, 1993]. Diese Methode verbesserte in einer limitierten Patientenzahl den Visus, jedoch zeigten sich viele postopertative Komplikationen wie die proliferative Vitreoretinopathie (PVR), Netzhautablösung oder Makulaödeme durch den diffizilen chirurgischen Eingriff [Aisenbrey *et al.*, 2002], [Eckardt *et al.*, 1999]. Die Weiterführung der Translokation mit Komplexen aus RPE und Choroidea aus der Peripherie in die Makularegion resultierte in vaskularisierten und funktionellen Transplantaten. Aber auch hier kam es in etwa der Hälfte der Operationen zu den bereits erwähnten Komplikationen [Caramoy *et al.*, 2010], [Chen *et al.*, 2009a], [Joussen *et al.*, 2006].

1.4.3 Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen

Ein weiteres Konzept der "*Maculoplasty*" ist die Transplantation von RPE Zellen anstelle der geschädigten Zellen. Theoretisch sollte eine Visusverbesserung erreicht werden, wenn die Zellen eine Monoschicht auf der Bruch'schen Membran entwickeln und die Grenzfläche zu den Photorezeptoren rekonstruieren. Erste Ansätze von subretinalen Transplantationen heterologer RPE Zellen mündeten jedoch in einer Abstoßungsreaktion des Transplantats [Algvere *et al.*, 1997]. Auch allogene RPE Zellen verursachten trotz des Immunprivilegs im subretinalen Raum signifikante Komplikationen in Form einer Abstoßung nach Zelltransplantation [Jiang *et al.*, 1993], [Jiang *et al.*, 1994].

Um dieses Problem zu umgehen, wurden Studien mit autologem RPE durchgeführt. Binder *et al.* berichten, dass eine Transplantation einer RPE Zellsuspension, die aus der Peripherie des gleichen Auges gewonnen wurde, zusätzlich zur Extraktion der subretinalen Membranen bei 50% der Patienten zu einer verbesserten Sehschärfe führte [Binder *et al.*, 2004]. Obwohl die Transplantation von RPE Zellen vorteilhaft gegenüber einer Membranentfernung allein ist, treten durch die Verwendung von Suspensionen Limitationen auf. Zum einen kann es während der Injektion zu einem Reflux der Zellen kommen, zum anderen zeigte sich in Patientenstudien sowie in *in vitro* Experimenten, dass RPE Zellen auf einer durch die AMD geschädigten Bruch'schen Membran nicht adhärieren und überleben [Ohno-Matsui *et al.*, 2005], [Priore *et al.*, 2006], [Tezel and Priore, 1999], [van Meurs *et al.*, 2004].

Ein erfolgversprechendes Verfahren zur Rekonstruktion der zerstörten Basalmembran scheint daher eine Transplantation von Pigmentepithelzellen auf einem biologisch abbaubaren Substrat zu sein. Dieses Substrat dient als temporäre Prothese, bis die transplantierten Zellen eine native Bruch'sche Membran rekonstruiert haben. Durch die Transplantation einer bereits bestehenden Zellmonoschicht in korrekter Polarität kann - im Gegensatz zur Injektion einer Zellsuspension - die Etablierung der funktionellen Einheit mit Photorezeptoren erleichtert werden [Binder *et al.*, 2007], [Thumann *et al.*, 2009].

1.4.4 Irispigmentepithel Zellen als Alternative zu RPE Zellen

Die Transplantation von RPE Zellen ist geeignet zur Rekonstruktion des subretinalen Raumes, es gibt aber auch Nachteile in der Verwendung dieser Zellen. Die chirurgische Isolation humaner RPE Zellen ist schwierig und birgt ein hohes Risiko von choroidalen Blutungen [Rezai *et al.*, 1997b]. Zudem ist bei der Verwendung autologer Zellen die Möglichkeit gegeben, dass die Zellen in der Peripherie den gleichen Defekt tragen wie Zellen der Makula. Daher ist das Interesse an Irispigmentepithel (IPE) als Alternative zu RPE Zellen in den letzen Jahren gewachsen.

Das IPE ist in zwei Monoschichten angeordnet, die über spezialisierte junktionale Komplexe an ihren Apices miteinander in Kontakt stehen. Embryogenetisch haben IPE Zellen den gleichen ektodermalen Ursprung wie retinale Pigmentepithelzellen. Das anteriore IPE entstammt wie auch das RPE aus dem äußeren Anteil des Augenbechers, wogegen sich das posteriore IPE wie die Netzhaut aus dem inneren Blatt des Augenbechers entwickelt. Der posteriore Zellverband ist pigmentiert und erfüllt wie das RPE unter anderem die Funktion der Lichtabsorption [Freddo, 1984]. Mittels einer Iridektomie, einer standardisierten Methode in der Glaukomchirurgie, können IPE Zellen vom Patienten leicht gewonnen werden. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass IPE Zellen eine Reihe von Genen für Zytokine und ihre Rezeptoren exprimieren, die in nativen RPE Zellen vorliegen [Kociok *et al.*, 1998]. Das Expressionsmuster stimmte zu 95% mit RPE Zellen überein. Die Transkription von Genen des Retinolstoffwechsels wie CRALBP und 11-cis-Dehydrogenase wurde in IPE Zellen ebenfalls nachgewiesen [Thumann *et al.*, 1999b]. Außerdem sind IPE Zellen wie RPE Zellen in Kultur in der Lage, Photorezeptoraußensegmente zu phagozytieren [Rezai *et al.*, 1997b], [Thumann *et al.*, 1998].

Im Kaninchenmodell zeigte sich, dass transplantierte Zellen im subretinalen Raum überlebten und eine adhärente Monoschicht bildeten [Crafoord *et al.*, 2001], [Thumann *et al.*, 1999a]. Nach Transplantation von autologen IPE Zellen im Rahmen einer Patientenstudie konnten die Zellen innerhalb von drei Jahren Nachbeobachtungszeit submakulär lokalisiert werden [Aisenbrey *et al.*, 2006]. In weiteren Studien wurde mittels IPE Zelltransplantation nach Entfernung der Neovaskularisation eine Stabilisierung oder Verbesserung der Sehschärfe erreicht [Abe *et al.*, 1999], [Abe *et al.*, 2007], [Lappas *et al.*, 2000], [Thumann *et al.*, 2000]. Eine Immunreaktion der Retina oder Abstoßung der transplantierten Zellen trat nicht auf [Abe *et al.*, 2000], [Aisenbrey *et al.*, 2006], [Lappas *et al.*, 2004], [Thumann *et al.*, 2000].

Darüber hinaus ist für RPE und IPE Zellen eine heterogene zelluläre Plastizität und das Potential zur Transdifferenzierung beschrieben [Asami *et al.*, 2007].

Schlussfolgernd stellen Irispigmentepithel Zellen eine potentielle Alternative zu RPE Zellen dar, um in der Umgebung des subretinalen Raumes Funktionen des RPEs auszuführen.

1.5 *Tissue Engineering*

Williams *et al.* definieren *Tissue Engineering* als die “Kreation eines neuen Gewebes zur therapeutischen Rekonstruktion des menschlichen Körpers mittels einer durchdachten und kontrol-

lierten Stimulation ausgewählter Zellen durch eine systematische Kombination von molekularen und mechanischen Signalen" [Williams, 2008].

Die Gewebezüchtung folgt dabei einem grundsätzlichen Schema bestehend aus Akquisition der Zellen, Zellmanipulation und Konstruktformierung. Darauf folgt die Implantation in den Empfänger und abschließend eine vollständige Integration in das Empfängergewebe [Williams, 2008].

Generell darf ein Biomaterial dem Wirtsgewebe nicht nur keinen Schaden zufügen, sondern soll zudem biologisch aktiv sein. Aufgrund seiner molekularen Struktur muss es im richtigen Umfang und Zeitraum Liganden für eine Zelladhäsion bereitstellen. Das Biomaterial soll eine bestmögliche zelluläre Antwort hervorrufen, um eine klinisch relevante Ausführung der Therapie zu optimieren [Williams, 2008].

Für den Ersatz des degenerierten retinalen Pigmentepithels durch die Transplantation bedeutet dies die Suche nach einem geeigneten Biomaterial, das als Träger für die zu transplantierenden Zellen geeignet ist. Wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben, bergen Injektionen von Zellsuspensionen Nachteile in sich, die mit Hilfe eines Komplexes aus Biomaterial und Zellverband, einem sog. Zell*sheet* überwunden werden könnten.

Im optimalen Szenario werden zukünftig Irispigmentepithel Zellen eines AMD Patienten nach einer Iridektomie isoliert und auf einem Biomaterial kultiviert (Abbildung 1.5). Die Zellen entwickeln eine konfluente Monoschicht mit allen charakteristischen Merkmalen von retinalen Pigmentepithelzellen. Die Differenzierung wird allein durch Signale des Biomaterials unterstützt. Sind die Zellen in ausreichendem Maße expandiert, folgt die Transplantation des Zell*sheets* subretinal in den Bereich der geschädigten Makula. Das Material dient bis zum Abbau als Ersatz der Bruch'schen Membran, während die Zellen eine natürliche extrazelluläre Matrix ausbilden und die Grenzfläche von Pigmentepithelzellen zu den Photorezeptoren funktionell wiederherstellen. Aufgrund der autologen Zellen und des bioverträglichen Substrates kommt es zu keiner Entzündungs- oder Abstoßungsreaktion.

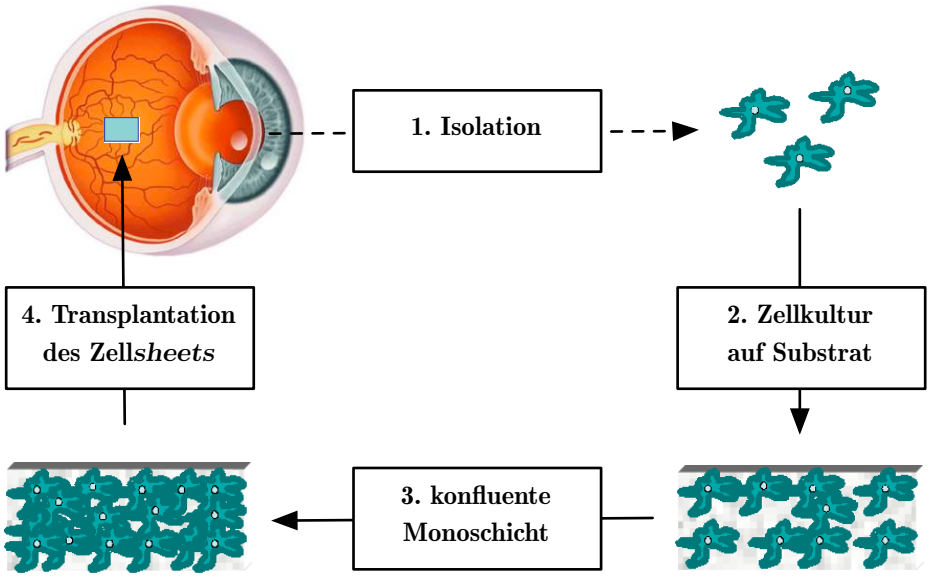


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Entwicklung eines potentiellen Transplantats bestehend aus autolog gewonnenen IPE Zellen, die *in vitro* auf einem biokompatiblen und abbaubaren Material kultiviert werden. Nach Ausbildung einer konfluenten Monoschicht wird das Konstrukt aus Zellen und Substrat subretinal im Bereich der Makula implantiert.

1.5.1 Trägermaterialien für Pigmentepithel Zellverbände

Altersabhängige Änderungen der Bruch'schen Membran spielen eine substantielle Rolle in Dysfunktionen des retinalen Pigmentepithels. Mit einem Ersatz der Bruch'schen Membran durch ein Biomaterial könnte eine bessere Matrix für RPE Zellen geschaffen werden [Binder *et al.*, 2007].

Folgende Anforderungen muss ein Biomaterial zur subretinalen Transplantation eines Zellverbandes erfüllen [Hynes and Lavik, 2010], [Lee *et al.*, 2006], [Singh *et al.*, 2001]:

- Stabilität für Handhabung in der Zellkultur und während der Transplantation
- Materialdicke in der Dimension der Bruch'schen Membran
- Permeabilität für Nährstoffe nach Transplantation
- Adhäsion und konfluentes Wachstum von Pigmentepithelzellen
- Biokompatibilität in okulären Strukturen
- Materialdegradation *in vivo*

Natürliche und synthetische Materialien wurden von verschiedenen Forschungsgruppen unter *in vitro* als auch *in vivo* Bedingungen auf ihre Eignung als Substrat für RPE und IPE Zellen untersucht. Zellen auf okulären Geweben, wie der inneren limitierenden Membran der Retina oder der Descemet-Membran der Cornea, zeigen eine gute Adhärenz und konfluentes Wachstum in Kultur [Beutel *et al.*, 2007], [Thumann *et al.*, 1997]. Allerdings sind diese natürlichen Materialien nur begrenzt verfügbar, was eine generelle Anwendung in der AMD Therapie erschwert. Eine Alternative stellen humane Amnionmembran und die humane Linsenvorderkapsel dar, denn sie stehen als Beigabe nach operativen Routineeingriffen zur Verfügung [Hynes and Lavik, 2010], [Lee *et al.*, 2006]. Eine Anwendung der Amnionmembran als Substrat liegt nahe, denn sie wird bereits häufig in der okulären Oberflächenrekonstruktion eingesetzt [Nubile *et al.*, 2008]. Nach Entfernung der Epithelzellschicht ist die Membran ein geeignetes Material für RPE und IPE in der Zellkultur, erweist sich aber als schwierig in der Handhabung während der Implantation [Ohno-Matsui *et al.*, 2005], [Ohno-Matsui *et al.*, 2006]. Die Linsenvorderkapsel weist mit $15 - 20$ µm eine angemessene Dicke als Trägermaterial auf, in Transplantationsexperimenten faltete sie sich jedoch aufgrund ihrer fehlenden Autostabilität mehrfach während der Implantation [Lee *et al.*, 2006], [Nicolini *et al.*, 2000].

Kollagen ist eine Hauptkomponente der Bruch'schen Membran und bietet sich daher als Trägermaterial für Pigmentepithelzellen an. Bhatt *et al.* zeigten bereits 1994, dass humane RPE Zellen auf unvernetztem Kollagen aus der Ratte eine stabile Monoschicht bildeten [Bhatt *et al.*, 1994]. Kollagen equinen Ursprungs zeigte ebenfalls in der Zellkultur und nach Transplantation positive Eigenschaften bezüglich des Zellwachstums und der Bioverträglichkeit [Thumann *et al.*, 2006], [Thumann *et al.*, 2009]. Die Herstellung dünner Kollagenmembranen in der Dimension der Bruch'schen Membran ist zudem möglich [Lu *et al.*, 2007].

Synthetische Polyester wie Polylactid-co-Glycolid (PLGA), Poly-L-Lactid (PLLA), Polyglycerolsebacat (PGS) und Polyorthoester (POE) haben den Vorteil unbegrenzter Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit. Materialeigenschaften wie Oberflächenbeschaffenheit, Dicke, Konsistenz oder Degradation sind in der Herstellung regulierbar. Als Substrat für Zellen sind sie geeignet [Giordano *et al.*, 1997], [Neeley *et al.*, 2008], allerdings spielen hier Zelltoxizität oder geringe Biokompatibilität eine größere Rolle als bei natürlichen Materialien.

Eine Optimierung synthetischer Materialien durch Oberflächenmodifikationen ist ein vielversprechender Ansatz im *Tissue Engineering*, der auch für Pigmentepithelzellen von Nutzen sein kann. Eine chemische Modifikation mit Zelladhäsionsdomänen der extrazellulären Matrix (EZM), wie beispielsweise die RGD-Sequenz, ergeben eine zusätzliche Möglichkeit der

kontrollierten Zellanheftung auf einem Material. Biofunktionalisierung von Oberflächen mit Strukturen wie poly-N-Acetyllactosamin (poly-LacNAc), die als Liganden für die galektin-vermittelte Zelladhäsion an die EZM dienen, kann ebenfalls die Bindung von Zellen erleichtern [Sauerzapfe *et al.*, 2009]. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass Peptide auf der Materialoberfläche das Zellverhalten wie Adhäsion, Migration oder Differenzierung positiv beeinflussen [Chan and Mooney, 2008].

1.6 Potentielle Trägermaterialien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Biomaterialien als Träger für Pigmentepithelzellen untersucht. Als Repräsentanten verschiedener Materialgruppen wurde Amnionmembran als natürliches Material, Kollagen und Seide als Vertreter der biologischen Polymere und Poly-L-Lactid (PLLA) als synthetisches Polyester ausgewählt.

- Kollagene sind Strukturproteine und Hauptbestandteile des Bindegewebes und der extrazellulären Matrix, sowie der Bruch'schen Membran. Sie werden überwiegend aus der Haut des Rindes und des Schweins, oder aus Sehnen des Pferdes gewonnen. Ihre Sekundärstruktur besteht aus einer Tripelhelix, die sich in Fibrillen und über Quervernetzungen zu makromolekularen Fasern formieren [Ruszczak and Friess, 2003]. Aufgrund ihrer geringen Antigenität werden Kollagene als Biomaterial im Bereich der Knochenregeneration und dermalen Wundheilung verwendet [d'Aquino *et al.*, 2009], [Moroi *et al.*, 2004].

- Die Amnionmembran ist Teil der Embryonalhülle und bildet die innere Eihaut der Fruchtblase bei Reptilien, Vögeln und Säugetieren, den sog. Amnioten. Sie besteht aus drei Schichten: einem einschichtigen Epithel, einer breiten Basalmembran und darunter liegend avaskulärem Mesenchym [Toda *et al.*, 2007]. Humanes Amnion wird nach einem Kaiserschnitt gewonnen und kann von dem angrenzenden Chorion leicht präpariert werden, da hier keine engen zellulären Bindungen vorliegen.

  Wie in Kapitel 1.5.1 erwähnt, findet Amnionmembran bereits Anwendung in der Rekonstruktion am Auge. Aufgrund von anti-imflammatorischen und anti-mikrobiellen Eigenschaften ist es ein bevorzugtes Material zur Re-Epithelialisierung der Cornea nach Verletzungen oder bei Stammzellinsuffizienz [Gomes *et al.*, 2005], [Sekiyama *et al.*, 2007], [Toda *et al.*, 2007]. In der Glaukomchirurgie zeigt es ebenfalls positive Eigenschaften [Barton *et al.*, 2001].

- Seide ist ein Proteinpolymer, das von Lepidoptera Larven wie der Seidenspinne und Seidenraupe gesponnen wird. Bei Seidenraupen besteht es aus leichten und schweren Ketten an Fibroin, die über einen sog. Seidenleim aus Proteinen der Sericinfamilie verbunden sind. In der Seide der Spinnen kommen dagegen keine leimartigen Proteine vor [Altman *et al.*, 2003].

  Wie Kollagen ist auch Seide ein faserartiges Protein, dass sich durch eine repetitive Primärsequenz auszeichnet. Daraus ergibt sich bei den meisten Seiden eine Homogenität der Sekundärstruktur in einem β-Faltblatt. Starke Wasserstoffbrückenbindung führen zu einer hohen Stabilität des Polymers [Chirila *et al.*, 2008]. Deshalb wurde Seide seit Jahrzehnten als Nahtmaterial operativ eingesetzt. Aufgrund von allergischen Reaktionen auf den Sericinanteil der Seide, wurden in den letzten Jahren andere Materialien als Nahtmaterial bevorzugt. Da jedoch die Entfernung oder der Austausch des Sericins möglich ist, steigt das Interesse an Seide als potentielles Material im Bereich des *Tissue Engineering* in den letzten Jahren wieder an [Altman *et al.*, 2003], [Meinel *et al.*, 2005]. Als

Trägermaterial für eine subretinale Transplantation ist Seide in der Literatur bisher nicht beschrieben.

- Elektrogesponnene Nanofasern haben im Bereich des *Tissue Engineering* ein weites Forschungs- und Anwendungsgebiet erhalten. Nanofasern befinden sich in der Größenordnung von biologischen Strukturen wie Proteinen. Aufgrund der Möglichkeit, mit der Methode des Elektrospinnens Nanofasern herzustellen, kann die fibrilläre Struktur der extrazellulären Matrix in Form eines dreidimensionalen Fasernetzwerkes nachgeahmt werden [Schofer *et al.*, 2009]. Daher sind Trägermatrices, die die natürliche Zellumgebung imitieren, ein interessanter Ansatz für die Kultivierung und Transplantation von Pigmentepithelzellen.

  Das in dieser Arbeit verwendete elektrogesponnene Vlies besteht aus Poly-L-Lactid-Fasern. PLLA ist ein hydrophobes, synthetisches Polymer. Aufgrund seiner semikristallinen Struktur und mechanischen Festigkeit ist es im Bereich der Knochenregeneration ein zugelassenes Biomaterial [Ratner, 2004]. Die Besonderheit der hier verwendeten Fasern ist ihre freitragende Eigenschaft. Die Faservliese werden nicht auf einem Substrat abgelegt, sondern so auf Aluminiumringen gesponnen, dass sich eine "freihängende" Netzstruktur ergibt.

1.7 *In vitro* Kulturen und das Tiermodell

In vitro Studien sind unverzichtbare Instrumente der Forschung. Hier ermöglichen Zellkulturen in einer kontrollierten Umwelt die Untersuchung von Strukturen, Morphologie und Interaktionen der Zellen miteinander und zu ihrem Substrat. Zelllinien bieten die Vorteile einer leichteren Handhabung und unbegrenzten Verfügbarkeit [Huhtala *et al.*, 2007]. Aufgrund ihrer Homogenität erhöhen sie die Reproduzierbarkeit von Untersuchungen.

Die humane Zelllinie ARPE-19 ist im Jahr 1986 spontan aus retinalen Pigmentepithelzellen eines 19-jährigen männlichen Spenders hervorgegangen. Die Zellen zeigen strukturelle und funktionelle Eigenschaften von retinalen Pigmentepithelzellen [Dunn *et al.*, 1996]. Daher sind sie ein etabliertes *in vitro* Modell für das retinale Pigmentepithel.

Unter Umständen fehlt es Zelllinien jedoch an Strukturen und Funktionen, die native Zellen innehaben. Es ist bekannt, dass differenzierte Zellen ihre spezialisierten Eigenschaften nach mehreren Passagen verlieren [Dunn *et al.*, 1996]. Deshalb werden in der vorliegenden Arbeit primäre Zellkulturen aus dem Rinderauge verwendet und untersucht. Sie spiegeln die natürliche Situation besser wider als immortalisierte Zelllinien.

Im Zusammenhang mit Biokompatibilität reichen *in vitro* Kulturen nicht mehr aus, um schlüssige Aussagen treffen zu können. Die Kommunikation zwischen Zellen im natürlichen Gewebeverband oder auch systemische Reaktionen lassen sich in Zellkulturen nicht ausreichend wiedergeben. Aus diesem Grund sind *in vivo* Untersuchungen im Tiermodell unerlässlich. Transplantationen der Biomaterialien in das Auge des Kaninchens wurden daher vorgenommen.

Die Ähnlichkeit von Kaninchen- und menschlichem Auge in Form und Größe und die leichte Handhabung der Tiere macht sie zu einem etablierten Modell in der Ophthalmologie. Im Gegensatz zur Netzhaut des Menschen sind die Nervenfasern der Kaninchenaugen myelinisiert und als weißes, von der Papille nasal und temporal ausgehendes Band zu erkennen. Dieses wird von wenigen retinalen Gefäßen begleitet. Da die Retina des Kaninchens nur teilweise vaskularisiert ist, bezeichnet man sie als merangiotisch [Gelatt, 2007]. Im Hinterabschnitt des Kaninchenauges sind keine spontanen Krankheiten beschrieben, die eine subretinale Transplantation beeinflussen könnten.

1.8 Zielsetzung der Arbeit und Vorgehensweise

In der vorliegenden Arbeit werden die vier Biomaterialen, equines Kollagen Typ I, humane Amnionmembran, Seidenmembran und Poly-L-Lactid Nanofasern, auf ihre Eignung als Trägermaterial für Pigmentepithelzellen untersucht.

Unterschiede in Zellwachstum, -überleben und Differenzierung von Primärzellen und der Zelllinie ARPE-19 auf den Biomaterialien sollen mittels molekularbiologischer und immunhistologischer Methoden herausgearbeitet werden. Außerdem sollen die Eigenschaften des retinalen Pigmentepithels mit denen des Irispigmentepithels verglichen werden, um Aussagen über eine alternative Anwendung des IPEs zur zellulären Rekonstruktion zu ermöglichen. Materialeigenschaften wie die Permeabilität sollen untersucht und die Stabilität und Handhabung in Bezug auf die *ex vivo* Kultur und anschließende Implantation ermittelt werden. Des Weiteren evaluiert eine *in vivo* Studie am Kaninchenmodell klinisch und histologisch die Biokompatibilität und das Degradationsverhalten der vier Materialien nach subkonjunktivaler und subretinaler Implantation.

Die untersuchten Kriterien sollen einen Gesamteindruck des jeweiligen Biomaterials vermitteln, der eine Beurteilung zur Anwendung hinsichtlich einer subretinalen Transplantation erlaubt. In der Diskussion werden die verschiedenen Materialien und ihre Nutzung als Teil eines Transplantats kritisch beleuchtet und in die aktuelle Forschungssituation eingebettet.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Biomaterialien

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende natürliche und synthetisch hergestellte Materialien als Träger für Zellverbände verwendet:

Biomaterial	**Quelle**
equine Kollagen Typ I Membran	Resorba Wundversorgung GmbH & Co.KG, Nürnberg
humanes Amnion	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz, Berlin
Seidenmembran	Spintec Engineering GmbH, Aachen
PLLA Nanofaservlies	Philipps Universität, Marburg

Kollagenmembran Die Membran besteht aus equinem Kollagen in einer Konzentration von 1 mg nativen Kollagenfibrillen pro Quadratzentimeter. Die Dicke des semi-transparenten Materials ist nach Angaben des Herstellers ca. 10 µm. Die Folienstücke von 1 cm^2 Größe werden steril und einzeln verpackt von der Firma Resorba zur Verfügung gestellt (Abbildung 2.1, A).

Amnionmembran Getrocknet und chemisch sterilisiert wird die Amnionmembran für die vorliegende Studie von dem Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz (DIZG) in Stücken von 50 cm^2 bis 100 cm^2 zur Verfügung gestellt. Da generell die Amnionmembran als temporärer biologischer Wundverband Einsatz findet, spielt die Dicke des Materials für diese Anwendung keine Rolle. Sie kann je nach Areal aufgrund von unterschiedlichen biologischen Beanspruchungen während der Schwangerschaft und von Spenderin zu Spenderin schwanken. Vor der experimentellen Verwendung wird die Epithelzellschicht entfernt (siehe Kapitel 2.2.1 und Abbildung 2.1, B).

Seidenmembran Dieses Material wird über eine Kombination aus Seidenraupenzucht mit biologischen Technologien hergestellt. Das Seidenprotein Fibroin ist dabei aus sechs Dimeren mit jeweils einer leichten und einer schweren Kette aufgebaut, die sich ohne Sericin um ein zentral gelegenes Fibrohexamid anordnen. Das Fibroin wird aus der Seidendrüse der Raupe direkt isoliert und über ein Gießverfahren, sog. *Biocasting*, zu Membranen verarbeitet. Diese sind transparent, flexibel und von 10 µm bis 20 µm Dicke. Die Membranen werden in 2 cm $\times$ 1, 5 cm großen Stücken und γ-sterilisiert (C) von der Firma Spintec bereitgestellt.

Nanofaservlies Das semitransparente Vlies besitzt eine Gesamtdicke von etwa 15 µm. Die sterile Herstellung erfolgt im Rahmen einer Kooperation in der Abteilung für Makromolekulare Chemie der Philipps-Universität Marburg. Bei dem Verfahren des Elektrospinnens wird die PLLA Polymerlösung durch eine Düse gepumpt. Diese Düse fungiert als Elektrode und ist 15 cm von dem Substrat entfernt, welches die Nanofasern aufnimmt und mit einer Gegenelektrode verbunden ist. Aufgrund einer angelegten Hochspannung tritt aus dem an der Düse hängendem Tropfen Polymerlösung ein Flüssigkeitsstrahl aus, der sich auf die Gegenelektrode zubewegt und dabei verjüngt [Greiner and Wendorff, 2007]. Auf diesem Weg verdunstet das Lösungsmittel und es werden feste Endlosfasern mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern oder Nanometern abgeschieden. Als Lösungsmittel wird Dichlormethan mit 3 wt.% ohne Leitsalze eingesetzt. Das entstehende Faservlies besteht aus Fasern von etwa 250 nm bis 770 nm Durchmesser und wird freitragend auf Aluminiumringe gesponnen (D). Auf den Ringen entsteht für das Vlies dabei eine Wandstärke von 2 mm. Da es bei gleicher Spinnzeit zu ungleichmäßiger Faserablegung kommen kann, variiert der Durchmesser der einzelnen Fasern und es kommt zu tropfenartigen Verdickungen, sog. *beads* auf einzelnen Fasern.

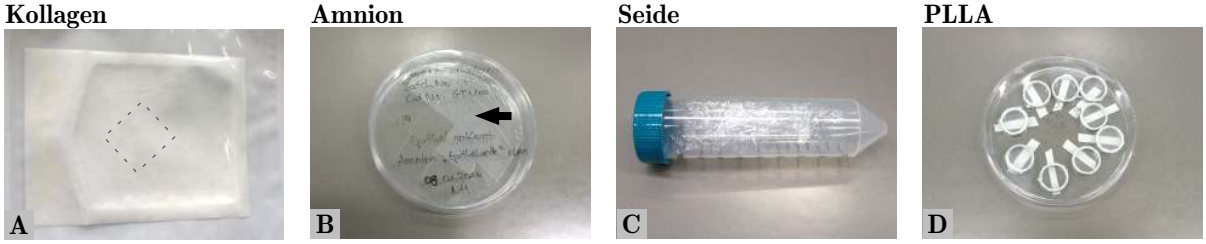


Abbildung 2.1: Biomaterialien, die in dieser Arbeit verwendet werden. (A) zeigt die doppelt steril verpackte Kollagenmembran, (B) Teile einer Amnionmembran nach Entfernung der Epithelzellschicht (Pfeil). Seide wird in Röhrchen zu je zehn Membranen erhalten (C) und die Faservliese, auf Aluminiumringe gesponnen, werden in einer Petrischale befestigt verschickt.

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Cryoblock	Medite, Burgdorf
DEPC	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Gelatine	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
$K_2Cr_2O_7$	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
NaCl	VWR, Darmstadt
Natriumcarbonat	Applichem, Darmstadt
Natriumhypochlorid 2,5%	Apotheke, Uniklinikum Aachen
$NaHCO_3$	Applichem, Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
$NaOH$	Merck, Darmstadt
Paraffin	Vogel, Gießen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Vectashield	Vector Labs, Burlingame, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-Loch-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
12-Loch-Platten	Nunc, Wiesbaden
24-Loch-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
2-Kammern-Objektträger (*culture slides*)	Becton Dickinson, Heidelberg
8-Kammern-Objektträger	Becton Dickinson, Heidelberg
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Einbettkassetten	Medite, Burgdorf
Einmalspritzen 10 ml und 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1, 5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Fettstift (PAP-PEN)	SCI, München
Filterpapier für Einbettkassetten	Medite, Burgdorf
Glasringe für die Zellkultur (Sonderanfertigung)	Quarz-Glas Heinrich bzw. Glasbläserei ITMC, RWTH Aachen
Inserts cell crown	Scaffdex, Tampere, Finnland
Inserts Costar clear	Costar Corning, New York, USA
Kanülen, Microlane	Becton Dickinson , Heidelberg
Latex Handschuhe	Maimed medical, Neuenkirchen
Mikrotom Einmalklinge, R35	Medite, Burgdorf
Mullkompressen	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel
Objektträger 76 x 26mm	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Superfrost	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petrischalen ∅ 3, 5 cm und 8, 5 cm	Nunc, Wiesbaden
Pipetten 5 ml und 25 ml	Greiner, Frickenhausen
Pipetten 10 ml	Costar® Vitaris, Baar
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Polypropylenröhrchen 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpelle No. 11 und 21	Feather, PFM, Köln
Zählkammer (Neubauer)	Brand, Wertheim

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zellkulturflaschen T-75	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Absauganlage	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Cutter (Vitrektomie)	Geuder AG, Heidelberg
Einbettautomat	Leica, Wetzlar
Endohm 12 Messkammer	World Presicion Instruments, Berlin
Entwässerungsautomat	Sakura, Zoeterwoude, NL
EVOM (*Epithelial Voltohmmeter*)	World Presicion Instruments, Berlin
Fluoreszenzmikroskop DM IRB/E	Leica, Wetzlar
Flureszenzmikroskop DM 6000B	Leica, Wetzlar
Heizplatte / Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Inkubator BBD 6220	Hereaus, Hanau
Light Cycler 2.0	Roche,Mannheim
Konfokales *Laser-Scanning*-Mikroskop	Leica, Wetzlar
Kritisch-Punkt-Trockner	Tousimis Autosamdri-814, Rockville, MD
Kryostat 1720 Digital	Leitz, Wetzlar
Makroskop Z16 APO	Leica, Wetzlar
Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Jena
OMNI-Gerät (Vitrektomie)	Fritz Ruck Ophthalmologische Systeme GmbH, Eschweiler
OP-Mikroskop OPMI 6-CFR XY 173336	Carl Zeiss AG, Jena
pH-Meter MP220	Mettler, Toledo
Rasterelektronenmikroskop	ESEM XL 30 FEG, FEI Philips, Eindhoven, NL
Schlittenbahnmikrotom	Jung AG, Heidelberg
Schüttler *mini gyro rocker SSM3*	Stuart®, Sigma, Deisenhofen
Spektrophotometer *Nanodrop*™ND-1000	Peqlab, Erlangen
Sterilbank	Hereaus, Hanau
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Vortexgerät MS3 digital	IKA, Staufen
Wasserbad SW 20	Julabo, Seelbach
Zentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 3K30	Sigma,
Zentrifuge für 15 ml und 50 ml Röhrchen	Hereaus, Hanau
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.5 Medien, –zusätze und Lösungen sowie ihre Zusammensetzung

Medium / Zusatz	**Hersteller**
Amphotericin B	PAA, Cölbe
Dulbecco's MEM / HAM's F-12 (1:1)	Biochrom AG, Berlin
Fetales Rinderserum (FBS)	PAA, Cölbe
Fortecortin 4 mg/ml	Merck KGaA, Darmstadt
Heparin (12500 I.E.)	Ratiopharm GmbH, Ulm
NaCl-Lösung 0,9%	DeltaSelect GmbH, Dreieich
PBS instamed	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (80 U/ml)	Promochem, Wesel
Ringerlösung	Braun, Melsungen
Trypsin 0,05 % inkl. EDTA	PAA, Cölbe
Trypsin 0,25 %	PAA, Cölbe

Medium / Lösung	**Zusammensetzung**
Zellkulturmedium (10%)	450 ml 1:1 DMEM/HAM's F12 50 ml FBS 4 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml Amphotericin B
10x PBS (Immunhistologie)	80 g $NaCl$ (1,37 mol/l) 2 g KCl (27 mmol/l) 11,5 g Na_2HPO_4 (83 mmol/l) 2 g KH_2PO_4 (15 mmol/l) ad 1 l H_2O dest., pH 6,8
1x PBS (Zellkultur)	9,514 g PBS instamed 1 l H_2O dest.
Permeabilisierungspuffer (0,5%)	100 µl Triton X-100 20 ml 1x PBS (pH6,8)
Blocklösung (5%)	1,0 g BSA 20 ml 1x PBS (pH6,8)
Antikörper-Lösung (0,8%)	0,16 g BSA 20 ml 1x PBS (pH6,8)
DAPI-Färbelösung (0,5 µg/ml)	Stammlösung (1 mg/ml in H_2O dest.) mit Methanol 1:1000 verdünnen, 1:2 Verdünnung der DAPI-Methanol- Lösung mit PBS (pH 6,8) herstellen.
25%ige Saccharose-Lösung	25 g Saccharose 100 ml 1x PBS
4% Paraformaldehyd	20 g PFA in 450 ml 1x PBS bei 60 °C lösen mit $NaOH$ auf pH 6,8 einstellen ad 500 ml 1x PBS
Vitalitäts-Färbelösung	10 ml PBS

Medium / Lösung	Zusammensetzung
	10 µl Fluoreszeindiacetat 50 µl Ethidiumbromid
Bromphenolblau-Stammlösung ($1 \times 10^{-4} M$)	0,0138388 g BPB ad 200 ml 1x PBS

2.1.6 Vital- und weitere Farbstoffe

Farbstoff	Hersteller
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dichlorid (DAPI)	Merck, Darmstadt
DTAF	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Fluoreszeindiacetat (FDA)	Sigma, München
Gold-Palladium	Denton DESK II, Morrestown, NJ
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe
PKH-26	Sigma, München
Propidiumiodid	Sigma, München
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma, Deisenhofen

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Alexa 488 α Maus	A11029	Mobitec, Göttingen
Alexa 488 α Kaninchen	A11034	Mobitec, Göttingen
Cytokeratin	M 0821	Dako, Hamburg
FITC-Phalloidin	77415	Fluka / Sigma, München
RPE65	NB 100-355	Novus Biologicals, Littleton, USA
ZO-1	61-7300	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8 RNA Isolation / PCR

Kit und Zubehör	Hersteller
LightCycler ®FastStart *DNA Master SYBR Green I*	Roche, Mannheim
LightCycler Kapillaren 20 µl	Roche, Mannheim
QIAshredder spin columns	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RNAse Away	MßP / Fisher Scientific, Schwerte
RNAse-Exitus Plus	Applichem, Darmstadt
RNAse free DNAse Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden

2.1.9 *Primer*

Gen Kennnummer	*Primer* Sequenz [5'-3']	Position	Schmelz-temp.	Produkt-größe [bp]	Verdünnung
GAPDH	*f*: ATC ATC CCT GCT TCT ACT GG	604 - 822	57,3 °C	219	1:10
NM_001034034	*r*: CTC AGT GTA GCC TAG AAT GC				
HPRT1	*f*: TTG CCG ACC TGT TGG ATT AC	260 - 519	57,3 °C	260	1:10
NM_001034035	*r*: CGC AAC CTT GAC CAT CTT TG				
RPE65	*f*: AGT GAC CGA TTC AAG CCA TC	697 - 1001	57,3 °C	305	1:50
NM_174453	*r*: CCT TTC CAG CAA CAG AGA TC				
CRALBP	*f*: AAG ACA GTG CCT TCT TCC TG	272 - 516	57,3 °C	245	1:50
NM_174451	*r*: GGT GAT TTC TTC AGA GTC CC				
CD86	*f*: GTG TCA GCT CTC AAC AAC AGG	2399 - 2671	59,8 °C	273	1:50
NM_001038017	*r*: TTC AAG CAT GGC TAG CGT AGG				
VEGF	*f*: AGT TCA TGG ATG TCT ACC AGC	667 - 857	57,9 °C	191	1:50
NM_174216	*r*: CTG CAT GGT GAT GTT GAA CTC				
PEDF	*f*: TTA CGG TAC GGC TTG GAT TC	804 - 1071	57,3 °C	268	1:50
AF017058	*r*: CAT CAA ACA GGG ATT GCA GC				
KRT8	*f*: CAG GCA ACT GTA TGA AGA GG	690 - 945	57,3 °C	256	1:50
NM_001033610	*r*: CTC AGA AAT CTC CGT CTT CG				
ZO-1	*f*: AAC CGC ACA CAA ACC TGA CC	1635 - 1916	59,4 °C	282	1:50
XM_582218	*r*: GTC TCA ATG GAG CTC AGC AC				
CathD	*f*: TGC CTG TCT TCG ACA ACC TG	635 - 886	59,4 °C	252	1:10
AB055312	*r*: TGT CCA CGA TAG CCT CAC AG				

2.1.10 Zellkulturen und Tiermodell

Die für *in vitro* Experimente verwendete retinale Pigmentepithel Zelllinie ARPE-19 stammt vom Anbieter ATCC (CRL-2302) in Wesel.

Als Quelle für primäre RPE und IPE Zellen dienen Augen des Hausrindes (*Bos taurus*). Die Augen werden ca. zwei Stunden *post mortem* vom Schlachthof Eschweiler bezogen.

Für die *in vivo* Versuche werden weibliche Chinchila Bastard Kaninchen (Charles River, Kisslegg) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 2-3 kg verwendet. Alle tierexperimentellen Studien werden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und sind von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (Versuchsnummer TV 1365 G1, Aktenzeichen 50.203.2AC3, 17/06 und TV 1367 G1, Aktenzeichen 50.203.2AC3 16/06). Die operativen Eingriffe am Kaninchen werden von Frau Univ. Prof. Dr. Gabriele Thumann ausgeführt.

2.1.11 *In vivo* Transplantation

OP-Material	**Hersteller**
Pentobarbital 0,16 g/ml	Merial, Hallbergmoos
Infusionsschlauch „Intrafix“	Braun Meisungen, Meisungen
Inzisionspflaster *Opsite*	Smith & Nephew Medical Limited, Hull, England
Isoptomax-Augentropfen	Alcon, Freiburg
Ketamin 10%	Sanofi Ceva, Düsseldorf
Kilp-Linse	Geuder, Heidelberg
Lochtuch *Foliodrape*	Hartmann, Heidenheim
Mersilene Fäden 3-0	Ethicon (Johnson & Johnson), Lenneke Marelaan,Belgien
Methocel 2%	Omni Vision, Puchheim
Mikroinstrumente (Scheren und Pinzetten)	DORC, Berlin
Nahtmaterial Nylon 10-0,	Resorba Wundversorgung, Nürnberg
Nahtmaterial Vicryl 7-0	Resorba Wundversorgung, Nürnberg
Nadel 36-Gauge	Geuder, Heidelberg
Nadel mit Steigrohrprinzip	Geuder, Heidelberg
PFCL „F-Decalin“, 1,93 g/cm^3	Fluoron (Geuder), Ulm
Phenylephrin-Tropicamid-Augentropfen 2,5%	Apotheke des Uniklinikums Aachen
Polyglyklosäure-Fäden 7-0	Resorba Wundversorgung, Nürnberg
Proparakain-Tropfen 0,5%	Ursapharm, Saarbrücken
Tätowiersalbe	Hauptner & Herberholz, Solingen
Xylazin 2%	Medistar Arzneimittelvertrieb, Ascheberg

2.1.12 *Software*

Software	**Hersteller**
Diskus Histologie ver.4.30.670-#206	Hilgers, Königswinter
Leica *Confocal Software (TCS Merge)*	Leica, Heidelberg
Rasterelektronenmikroskopie	Gatan Inc, Pleasanton, CA
SND-1000 V3.1.2 (Spektrophotometer)	Peqlab, Erlangen
The Gimp	www.gimp.org
VUCCD (*Visual Ussing Doubletracking CCD-Photometer*)	S. Tholl, Matricel, Aachen

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung der Biomaterialien

Vor dem Gebrauch von Amnionmembranen in der Zellkultur und für *in vivo* Versuche muss die Epithelschicht von der laminin-haltigen Basalmembran entfernt werden. Dazu wird die Amnionmembran mit der Epithelseite nach oben in einer Petrischale mit einer 0,05%igen Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt und 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach können mit einem Zellschaber die Epithelzellen entfernt werden. Das überschüssige Trypsin wird abgesaugt und die Aktivität des Enzyms durch serumhaltiges Medium inaktiviert. Nach zwei 15 minütigen Waschschritten mit phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) wird das Amnion unter der Sterilbank getrocknet und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur (RT) in der Petrischale gelagert.

Damit die Kollagen- Amnion- und Seidenfolien während der Zellaussaat und im Kulturverlauf glatt liegen, werden sie mit angefertigten Glasringen von $1,54\ \text{cm}^2$ oder $0,78\ \text{cm}^2$ Innenfläche beschwert (Abbildung 2.2, A und B). Vor der Aussaat von Zellen auf den Biomaterialien werden diese in eine 6-Loch oder 12-Loch-Platte gelegt und mit PBS überschichtet. Mit einem Zellschaber werden die Folien glatt gestrichen und Luftblasen unterhalb der Folie entfernt. Das PBS wird vorsichtig abgesaugt, so dass die Folien auf dem Plastikboden zu liegen kommen. Ein Glasring wird am unteren Rand ebenfalls mit PBS benetzt und auf das Folienstück gestellt. Alternativ werden die Folien in *cell crowns* eingespannet (Innenfläche ebenfalls 0,78 cm^2). Hierfür wird ein Folienstück auf den unteren Rand des umgedrehten *Inserts* gelegt. Um das System abzudichten wird eine Lage sterilen Mulls auf die Folie gelegt und ein zum *Insert* gehörender Ring über das Konstrukt gestülpt (C und D, weißer Pfeil). Das *cell crown Insert* wird mittels kleiner Flügel (D, schwarzer Pfeil) in Kavitäten von 24-Loch-Platten eingehängt und ermöglicht somit eine Mediumzufuhr von der apikalen und basalen Seite der Folie. Für die Zellkultur auf PLLA Faservliesen können nur die *cell crowns* verwendet werden.

Unmittelbar vor einer Zellaussaat wird Medium außerhalb der Glasringe oder *Inserts* vorgelegt, um einen Auswärtssog der Zellsuspension zu vermeiden.

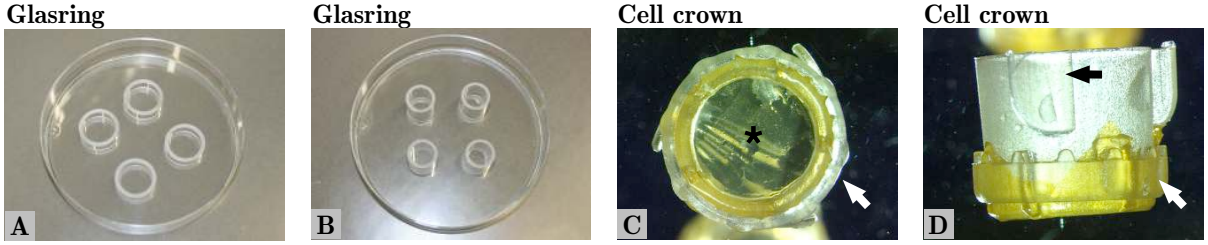


Abbildung 2.2: Die Biomaterialien werden für die Besiedelung mit Zellen mit Glasringen verschiedener Größen beschwert (A, B) oder in einen Zellkultureinsatz (sog. *cell crown*) eingespannt (C, $*\ \widehat{=}$ Biomaterial). Das *cell crown* kann mittels seiner Flügel in eine Kavität einer 24-Loch-Platte eingehängt werden (D, schwarzer Pfeil).

2.2.1.1 DTAF Färbung von Biomaterialien

Zur besseren Darstellung der Folien und zur Lokalisation in *in vivo* Experimenten werden die Biomaterialien mit einem nicht-toxischen gelben Fluoreszenzfarbstoff Dichlorotriazinylamino-Fluoreszein (DTAF) gefärbt. In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wird unter sterilen Bedingungen aus der 2%igen Stamm-Färbelösung eine 1:4 Verdünnung mit 0,2 mol/l Natriumbicarbonat hergestellt. Ein Stück Folie wird mit einer Pinzette in das Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Material 2 min bei RT gefärbt. Anschließend wird der überschüssige Farbstoff

in einer 6-Loch Platte mit sterilem PBS mehrere Male aus der Folie ausgewaschen. Die Folie kann in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß in PBS bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert werden.

2.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie ist eine Methode, um Proben vom Mikrometer- bis hin zum Nanometerbereich zu visualisieren. Strukturen, die mit einem Lichtmikroskop nicht mehr aufgelöst werden können, sind so charakterisierbar.

Um die Oberflächenbeschaffenheit der Biomaterialien darzustellen, werden die nativen Biomaterialien trocken für die Mikroskopie verwendet. Eine wie für Zellproben übliche Fixierung und Trocknung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe in CO_2 jenseits des kritischen Punktes ist hier nicht nötig. Die Materialien werden direkt auf Probentellern mittels einer Kathodenzerstäubungsanlage mit 30 nm Gold beschichtet. Untersucht werden die Proben in einem Rasterelektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV (Sekundärelektronendetektor).

2.2.3 Beurteilung der Hydrophilie der Materialien

Diese Versuchsreihe wird als erste Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften der vier Materialien im Vergleich durchgeführt. Über die Fläche eines Tropfens auf den trockenen Materialien wird punktuell das Benetzungsverhalten an der Oberfläche der Materialien bestimmt. Hierzu wird ein Wassertropfen mit 5 µl Volumen auf dem trockenen Material platziert und nach 20 s und 80 s in Aufsicht fotografiert. Mit Hilfe der Diskus *Software* wird anschließend die Fläche des Tropfens ermittelt. Pro Material werden jeweils drei Tropfen in zwei Vergrößerungen aufgenommen und der Median aus diesen Flächenangaben gebildet. Je größer die Fläche des Tropfens, desto flacher ist dieser. Eine größere Kontaktfläche zum Material lässt auf hydrophile Oberflächeneigenschaften rückschließen.

2.2.4 Bestimmung der Diffusion durch Biomaterialien

Ein Charakteristikum von Biomaterialien ist deren Durchlässigkeit, die eine Diffusion von Molekülen erlaubt. Die Diffusion wird maßgeblich durch den sog. Diffusionskoeffizienten D beschrieben.

Diffusion liegt der Gesetzmäßigkeit zugrunde, dass die Stoffmengenänderung an einem Ort $\vec{x}$ zu einer bestimmten Zeit t proportional zu einem Konzentrationsgradienten am gleichen Ort zur gleichen Zeit ist. Da es kein Messinstrument zur direkten Erfassung des Diffusionskoeffizienten gibt, kann dieser nur indirekt ermittelt werden. Dazu wird ein Zusammenhang aus der Photometrie ausgenutzt, bei dem eine messbare Extinktion (Restlichtintensität) in eine Konzentration überführt werden kann.

Der Versuchsaufbau sowie die verwendete *Software* zur Charakterisierung der Diffusion einer gefärbten Lösung durch die Biomaterialien wurden im Rahmen einer Studienarbeit an der Fachhochschule Aachen von Herrn Sacha Tholl unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Günter Lauth entwickelt. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung eines Photometers mit einfachen Mitteln. In Kooperation mit Herrn Dipl. Ing. (FH) Sacha Tholl und der Firma Matricel GmbH, Herzogenrath werden die vorliegenden Messungen durchgeführt und ausgewertet.

Im Folgenden werden die physikalischen Grundlagen und der Versuchsaufbau zur Beobachtung und Auswertung der Diffusion einer Bromphenolblau (BPB) Lösung beschrieben.

2.2.4.1 Photometrie

Tritt ein Lichtstrahl durch ein Material oder eine gelöste Substanz, kommt es zu einer Schwächung des Lichtes aufgrund der Absorption durch dieses Material bzw. die Substanz. Die relative Intensitätsabnahme des Lichtstrahls ist proportional zu der durchquerten Materialdicke und der Konzentration des absorbierenden Stoffes. Für eine bestimmte Lichtwellenlänge (λ) lässt sich die Restlichtintensität (Extinktion) wie folgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz beschreiben:

$$E_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \epsilon(\vec{x}) \cdot c \cdot d_K(\vec{x}) \quad , \tag{2.1}$$

mit der Strahlungsintensität I_0 vor dem Durchgang durch die Substanz, der Intensität I_1 nach dem Durchtritt, dem molaren Extinktionskoeffizient Epsilon (ϵ) der Substanz, der Konzentration c des Mediums und der Dicke d_K des durchstrahlten Stoffes.

Epsilon (ϵ) ist ein Maß dafür, wieviel Strahlung des durchströmenden Lichtes die Substanz in einer gegebenen Konzentration und bei der Wellenlänge λ absorbiert.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur für monochromatische Strahlung (Licht) und klare Lösungen. In trüben Lösungen kommt es neben der Absorption zu einer starken Streuung der Strahlung, so dass die Absorption verfälscht wird. Bis zu einer Konzentration von $0,02$ mol/l können Substanzen absorptionsphotometrisch gemessen werden, da in derart verdünnten Lösungen jedes Molekül das Licht unabhängig von den anderen Molekülen aufnehmen kann.

Anstelle eines Photometers wird in der vorliegenden Arbeit für die Extinktionsmessung eine Videokamera eingesetzt, die einen CCD Sensor enthält. Dieser Sensor besteht aus vielen lichtempfindlichen Halbleitern, die in einem zweidimensionalen Abtastraster angeordnet sind. Jeder Halbleiter liefert proportional zur eingestrahlten Lichtmenge eine Spannung, die im Weiteren analog/digital (A/D) gewandelt wird und wertdiskret in einem Zahlenbereich $H \in [0, 1, \cdots, 255]$ vorliegt. Aufgrund der räumlichen Anordnung der Halbleiter liegen die Helligkeitswerte H ortsabhängig vor. H lässt sich wie folgt beschreiben:

$$H = P \cdot I \ , \tag{2.2}$$

mit dem Proportionalitätsfaktor P und der Strahlungsintensität I. Zur Berechung der Extinktion wird die Strahlungsintensität vor und nach Durchtreten einer Substanz ins Verhältnis gesetzt. Da nur das Verhältnis der Strahlungsintensitäten von Interesse ist, können auch die A/D gewandelten Werte H ins Verhältnis gesetzt und der Proportionalitätsfaktor P wie folgt in der Gleichung gekürzt werden:

$$E_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \log\left(\frac{P \cdot I_0}{P \cdot I_1}\right) = \log\left(\frac{H_0}{H_1}\right) \ . \tag{2.3}$$

Daher sind zwei Messungen mit Hilfe des CCD Sensons notwendig, um die Extinktion einer Substanz zu bestimmen: Eine Messung ohne Substanz liefert H_0 und eine Messung mit eingebrachter Substanz H_1.

Dieser Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration findet im Weiteren Anwendung, um die Konzentration einer Lösung während eines Diffusionsprozesses zu bestimmen.

2.2.4.2 Diffusionsprozesse und das 1. Fick'sche Gesetz

Die Diffusion ist ein physikalischer Prozess, der zu einer gleichmäßigen Verteilung von Teilchen und somit zur vollständigen Durchmischung zweier Stoffe führt [Jahrreiss, 1985].

Eine gerichtete Wanderung von Teilchen erfolgt immer dann, wenn ein Dichtegefälle ($-dN/dx$) einer Teilchenart vorliegt [Arlt, 1989], [Lee *et al.*, 2006]. Diese Wanderung (Diffusion) führt zu einer Teilchenstromdichte $\vec{J}$. Die Teilchenstromdichte $\vec{J}$ bezeichnet die Anzahl N der Teilchen, die in der Zeit t durch eine senkrecht zum Diffusionsstrom stehende Fläche $\vec{A}$ diffundieren:

$$\vec{J} = \frac{1}{\vec{A}} \frac{\partial N(\vec{r}, t)}{\partial t} \tag{2.4}$$

Die Teilchenstromdichte $\vec{J}$ ist erfahrungsgemäß dem Dichtegefälle an einem Ort $\vec{r}$ zu einem Zeitpunkt t proportional. Dieser Umstand wird durch das 1. Fick'sche Gesetz beschrieben:

$$\vec{J} = -D \text{ grad}\left(c(\vec{r}, t)\right) \ , \tag{2.5}$$

mit c der Konzentration der Teilchen. Der Diffusionskoeffizient D (Proportionalitätsfaktor der Gleichung) ist ein Maß für die Beweglichkeit von Teilchen in einer bestimmten Zeit (Δt).

Nun wird die Diffusion durch eine Membran betrachtet. Hierbei kommt es zu einer fortlaufenden Änderung der Konzentrationen und auch der Stoffmengen N auf beiden Seiten der Membran, wodurch der Konzentrationsgradient weiterhin eine Funktion der Zeit bleibt. Dabei ist er aufgrund des senkrechten Teilchenstroms bezüglich der Membranfläche nur von einer Richtung abhängig und das 1. Fick'sche Gesetz vereinfacht sich zu:

$$\vec{J} = -D \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} \ . \tag{2.6}$$

Teilt in einem geschlossenen System eine Membran der Dicke d zwei Kompartimente verschiedener Konzentrationen c_1 und c_2, lässt sich der Konzentrationsgradient über der Membran wie folgt ausdrücken:

$$\frac{c_1(t) - c_2(t)}{d} = \frac{\Delta c(t)}{d} \tag{2.7}$$

und das 1. Fick'sche Gesetz für diesen Fall lautet:

$$\vec{J} = -D \frac{\Delta c(t)}{d} \ . \tag{2.8}$$

Zudem beträgt die Teilchenmenge N des gesamten Systems:

$$N = c_1(t)V_1 + c_2(t)V_2 = \text{konst.} \ , \tag{2.9}$$

mit den Konzentrationen c_1 und c_2 zur Zeit t und dem jeweiligen Volumen V_1 und V_2 der beiden Kompartimente. Im Weiteren werden die zeitabhängigen Größen zugunsten einer besseren Lesbarkeit ohne ihren Zeitindex (t) dargestellt. Betrachtet man die Teilchenmenge differentiell bezüglich der Zeit, ergibt diese die Stoffmengenänderung:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \frac{\partial c_1}{\partial t} V_1 + \frac{\partial c_2}{\partial t} V_2 \ . \tag{2.10}$$

Setzt man Gleichung (2.4) in Gleichung (2.8) ein und löst die resultierende Gleichung nach der Stoffmengenänderung auf, so erhält man:

$$\frac{\partial N(\vec{r}, t)}{\partial t} = -D\vec{A} \ \frac{\Delta c}{d} \ . \tag{2.11}$$

Zusammen mit Gleichung (2.10) ergibt sich eine Differentialgleichung, die als einzige unbekannte Größe den Diffusionskoeffizienten D enthält:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \frac{\partial c_1}{\partial t} V_1 + \frac{\partial c_2}{\partial t} V_2 = -D \ \vec{A} \ \frac{\Delta c}{d} \ . \tag{2.12}$$

Mit den Randbedingungen der beiden Konzentrationen $c(t)$ und dem Volumen V:

$$c_1(t = 0) = c_0 \ , \tag{2.13}$$

$$c_2(t = 0) = 0 \ , \tag{2.14}$$

$$c_1(t = \infty) = c_2(t = \infty) = \frac{c_0}{2} \ , \tag{2.15}$$

$$V = V_1 = V_2 \ , \tag{2.16}$$

sowie der Anfangskonzentration c_0, lautet die Lösung der Differentialgleichung für $c_2(t)$ wie folgt:

$$c_2(t) = \frac{c_0}{2} \left\{ 1 - e^{-\frac{2D}{V}\left(\frac{A}{d}\right)t} \right\} \ . \tag{2.17}$$

$c_2(t)$ beschreibt die Konzentration des zweiten Kompartiments über der Zeit.

2.2.4.3 Berechnung des Diffusionskoeffizienten

Der Diffusionskoeffizient D ist bereits in Gleichung (2.17) enthalten. Nach D aufgelöst erhält man folgenden Ausdruck:

$$D = \ln \left(\frac{c_0}{c_0 - 2 \ \cdot \ c_2(t)} \right) \frac{V}{2A} \ \cdot \ \frac{d}{t} \ . \tag{2.18}$$

Die Größen V, A, d und c_0 sind bekannt. Daher ist der Diffusionskoeffizient nur noch von der Zeit t und der unbekannten Konzentration $c_2(t)$ abhängig. Wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben kann mittels der Photometrie eine Extinktion in eine Konzentration transformiert werden, und damit die unbekannte Größe experimentell gewonnen werden.

Dazu muss die Dicke $d_K(\vec{x})$ des durchstrahlten Mediums und der Faktor $\epsilon(\vec{x})$ aus 2.1 bestimmt werden. Dieser Faktor ist stoffabhängig und eine Funktion des Ortes. Die Dicke $d_K(\vec{x})$ ist im Allgemeinen auch ortsabhängig, wird jedoch in diesem Versuchsaufbau als konstant angenommen (vgl. Kapitel 2.2.4.5). Da die in dieser Arbeit untersuchten Lösungen alle homogen sind, verliert der Faktor ϵ seine ortsabhänigkeit und wird zu einer Konstanten, die zusammen mit der Dicke d_K multipliziert den Proportionalitätsfaktor zwischen der Extinktion und der Konzentration darstellt.

Zunächst wird eine sog. Eichreihe erstellt, bei der zu definierten Konzentrationen einer Lösung die dazugehörige Extinktion gemessen wird. Die Werte zwischen den Messpunkten der Eichreihe werden mit Hilfe einer Regressionsgeraden interpoliert.

Um den Diffusionskoeffizienten zu ermitteln wird ein Diffusionsprozess gestartet und währenddessen kontinuierlich photometrisch beobachtet. Zu bestimmten Zeitpunkten werden die vorliegenden Extinktionen erfasst. Mit Hilfe der Eichgeraden werden die Extinktionen in Konzentrationen überführt. Zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten D, ist theoretisch nur die Konzentration der Lösung zu einem beliebigen Zeitpunkt des Prozesses notwendig. Jedoch gibt es messtechnische Randbedingungen, die die Wahl des Zeitpunktes eingrenzen.

Zu Beginn des Diffussionsprozesses ist die Konzentrationsänderung sehr hoch, so dass ein kleiner Fehler bei der Zeitmessung einen großen Fehler bei der Konzentrationsmessung zur Folge hat. Neigt sich der Diffusionsprozess dem Ende entgegen, so ist die Konzentrationsänderung sehr gering. In der Folge ist auch die Extinktionsänderung sehr gering. Eine niedrige Extinktionsänderung ist messtechnisch schlecht zu erfassen, da die Helligkeitsauflösung des CCD Sensors beschränkt ist. Der Zeitpunkt, an dem 95% Ausgleich der Lösungen vorliegt ($T_{95\%}$), wurde anhand des Anwendungswissens des Kooperationspartners als geeigneter Zeitpunkt übernommen.

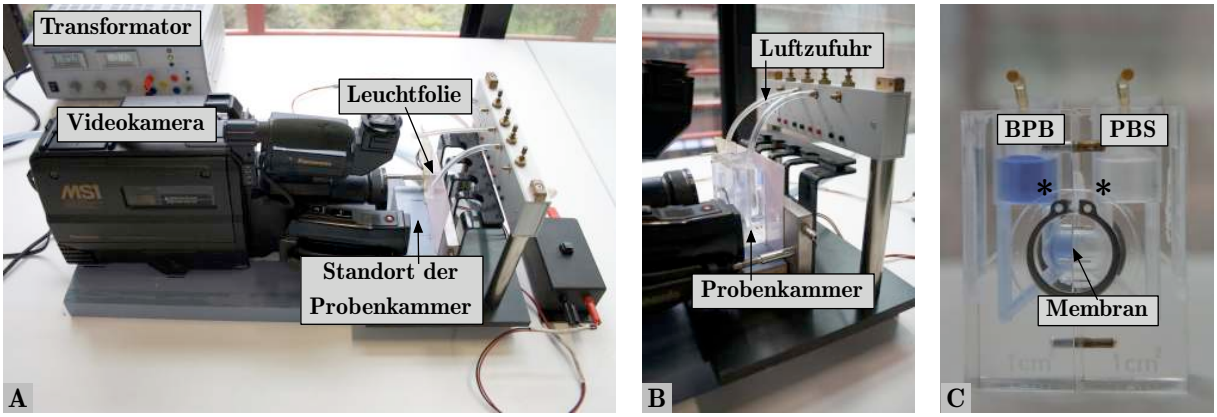


Abbildung 2.3: Messaufbau für Diffusionsmessungen durch Biomaterialien (A, B). Die Probenkammer wird durch ein eingespanntes Biomaterial in zwei Kompartimente getrennt und mit BPB- bzw. PBS-Lösung (C) befüllt. Die Sterne markieren den Ort, an dem die Kamera die Helligkeitswerte erfasst.

2.2.4.4 Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten

Um das in Kapitel 2.2.4.3 beschriebene Verfahren auf die Biomaterialien anzuwenden, wird folgender Messaufbau benutzt (Abbildung 2.3):

Als Lichtquelle dient eine 0,5 mm dünne, weiße Elektrolumineszenz-Leuchtfolie, die 50 cd/cm^2 Lichtmenge liefert (Abbildung 2.3, A). Für den Betrieb wird diese Folie an einen spannungsstabilisierten Transformator mit einer Stromstärke von 100 mA und einer Ausgangsspannung von 5 V angeschlossen. Direkt vor die Leuchtfolie wird das zu messende Biomaterial in einer modifizierten Ussing-Kammer so aufgestellt, dass das Material im rechten Winkel zur Leuchtfolie steht. Die Lichtstrahlung verläuft somit parallel zum Biomaterial und senkrecht durch die absorbierenden Lösungen (B, C). In dem einen Kompartiment befindet sich eine Bromphenolblau Lösung, im anderen Kompartiment phosphat-gepufferte Kochsalzlösung. Eine Videokamera wird vor der Probenkammer so positioniert, dass der Umriss der Kammer im Okular der Kamera fokussiert zu sehen ist. Die Lichtempfindlichkeit der Kamera wird manuell eingestellt, so dass bei ungestörtem Lichtweg die Photometersoftware den höchstmöglichen Intensitätswert anzeigt. Damit der hellste und dunkelste Wert von der Kamera erfasst werden kann, wird die Blende entsprechend eingestellt. Die Kamera selbst ist mit einem Computer verbunden.

Die Restlichtintensität (Extinktion), welche nach dem Durchgang des Lichtes durch die Bromphenolblau- bzw. PBS Lösung austritt, wird vom CCD Sensor der Videokamera als Helligkeitswert erfasst (vgl. Kapitel 2.2.4.1). Mit Hilfe der VUCCD *Software* werden die Helligkeitswerte ins Verhältnis zu dem initial gemessenen I_0 gesetzt und nach Gleichung (2.3) eine Extinktion aufgezeichnet.

Der zu analysierende Bildbereich der Probenkammer wird ebenfalls mittels der *Software* eingestellt (Abbildung 2.3, C und Abbildung 2.4, A).

2.2.4.5 Diffusionsmessung durch Biomaterialien und native Gewebe

Wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben, wird zur Transformation von gemessenen Extinktionen in Konzentrationen eine Eichreihe benötigt. Hierfür werden Lösungen bekannter Konzentrationen aus einer $1 \times 10^{-4} M$ Bromphenolblau Stammlösung angesetzt und ihre Extinktion in Einzelaufnahmen gemessen (Tabelle 2.13). Bromphenolblau ist ein Trimethylmethanfarbstoff mit einem

Tabelle 2.13: Lösungen bekannter BPB Konzentrationen werden ausgehend von einer Stammlösung angesetzt, um photometrisch ihre Extinktion zu messen.

Konzentration [mol/l]	**Stammlösung BPB [ml]**	**PBS [ml]**
$1,30 \times 10^{-5}$	26,00	ad 200
$1,16 \times 10^{-5}$	23,20	ad 200
$1,00 \times 10^{-5}$	20,00	ad 200
$8,36 \times 10^{-6}$	16,72	ad 200
$6,60 \times 10^{-6}$	13,20	ad 200
$5,00 \times 10^{-6}$	10,00	ad 200
$3,20 \times 10^{-6}$	6,40	ad 200
$1,68 \times 10^{-6}$	3,36	ad 200
$1,00 \times 10^{-6}$	2,00	ad 200
$5,00 \times 10^{-7}$	20,00 (der 5×10^{-6} Lösung)	ad 200
$2,50 \times 10^{-7}$	10,00 (der 5×10^{-6} Lösung)	ad 200

Molekulargewicht von $696,96$ g/mol und einem Absorptionsmaximum zwischen 590 nm und 595 nm (bei pH 4,6).

Die Messung der Extinktionen für die Eichgerade erfolgt ohne ein trennendes Biomaterial in der Kammer, so dass im gesamten Volumen die Konzentration gleich ist. Da der CCD Sensor ortsabhängig leicht unterschiedliche Helligkeitswerte erfasst, müssen die Extinktionen für beide Kompartimente gemessen werden.

Wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben, ist die Dicke $d_K(\vec{x})$ der durchstrahlten Kammer mit den BPB Lösungen in diesem Versuchsaufbau konstant. Die Messkammer besteht aus zwei Kompartimenten in der Form eines Quaders, in dessen Innerem je ein Zylinder die Testlösungen BPB oder PBS enthält (siehe Abbildung 2.3, B und C). $d_K(\vec{x})$ entspricht dem Durchmesser dieser Zylinder. Da der zu analysierende Bildbereich mit der *Software* auf einen sehr kleinen Ausschnitt von 9×9 Pixel eingestellt wird und in allen Versuchen gleich bleibt, ist die Dicke d_K hier als konstant und somit ortsunabhängig anzusehen.

Vor der Erstellung der Eichwerte und im Weiteren vor jedem Diffusionslauf wird die *Software* auf den zum Experiment passenden Wertebereich kalibriert. Dazu wird die gesamte Kammer mit PBS befüllt und vor der Kamera positioniert. Um den Aufbau vor Umgebungslicht abzuschirmen wird dieser mit einem Karton abgedeckt. Der höchste Helligkeitswert, der nach dem Durchtritt des Lichtes durch die PBS Lösung gemessen wird, entspricht hier dem Wert I_0.

Im Anschluss werden, beginnend mit PBS, bis zur höchsten Konzentration von Bromphenolblau 10 ml der jeweiligen Lösung in die Kammer gefüllt und die Extinktion gemessen. Die Kammer wird jeweils mit der nächst höher konzentrierten Lösung zweimal gespült, um Verdünnungen aufgrund von Restflüssigkeit zu vermeiden. Hilfslinien auf der Bedieneroberfläche der *Software* stellen sicher, dass die Kammer stets an derselben Stelle vor der Leuchtfolie positioniert wird (Abbildung 2.4, A). Von jeder Konzentration werden drei Messungen aufgezeichnet. Diese Daten werden in eine Tabelle überführt und für jede Bromphenolblau Konzentration der Mittelwert der Extinktion gebildet.

Die Permeabilitätseigenschaft der Kollagen-, Amnion- und Seidenmembranen sowie der nanogesponnenen PLLA Vliese wird mittels kontinuierlicher photometrischer Beobachtung der Diffusion einer 1×10^{-5} mol/l BPB Lösung durch die Testmaterialien bestimmt. Da die Konzentration der BPB Lösung stark verdünnt ist, tritt keine Streuung und somit keine Verfälschung der Extinktionswerte auf (vgl. Kapitel 2.2.4.1). Als Vergleichsmaterial werden neben den Biomaterialien native Gewebe bestehend aus Bruch'scher Membran und Choroidea (BM-CH) von

Rinderaugen und humanen Spenderaugen mitgeführt.

Vor Beginn eines Diffusionslaufes wird die *Software* wie vor der Eichmessung mit 10 ml PBS auf den höchsten Helligkeitswert (I_0) eingestellt. Die Kammer wird geleert, mit Ethanol ausgewaschen und getrocknet. Im Anschluss werden beide Kompartimente an ihren Kontaktflächen mit Silikonfett bestrichen, um das System optimal abzudichten. Dann wird das Biomaterial trocken auf ein Kompartiment gelegt und glatt positioniert. Mit dem anderen Kompartiment wird die Kammer verschlossen.

Die bovinen und humanen Gewebe werden nach Präparation auf einem Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Anfeuchten mit PBS werden sie flexibel und können auf die Kammer transferiert werden. Die Gewebe werden so eingespannt, dass die Bruch'sche Membran zum PBS und die choroidale Seite zur Bromphenolblau Lösung gerichtet ist. Auch Amnion wird mit der Seite des entfernten Epithels zum PBS Kompartiment orientiert eingespannt, bei den anderen Biomaterialien ist die Orientierung dagegen unerheblich.

Beide Kompartimente der Kammer werden mit einem Volumen von 5 ml befüllt, die linke Seite mit BPB Lösung, die rechte Seite mit PBS (Abbildung 2.3, C). Als Verdunstungsschutz werden die Kompartimente mit Deckeln versehen und die Kammer vor der Leuchtfolie positioniert. Um eine stetige Durchmischung der Lösungen zu gewährleisten, wird über Schläuche Luft mit $0,5$ bar Luftdruck in die Kompartimente eingeführt (B). Abschließend wird der Messaufbau wieder mit einem Karton abgedeckt, um ihn gegen Umgebungslicht abzuschirmen.

Am Computer kann der Farbausgleich der Lösungen in Echtzeit verfolgt werden, wobei die Position der Kammern spiegelverkehrt angezeigt wird (Abbildung 2.4, A). Anhand von Zeigern werden die Extinktionswerte beider Kompartimente sowie die Rohwerte der Videokamera angezeigt (A). Im Verlauf der Diffusion führt die *Software* die gemessenen Extinktionen je Zeitpunkt tabellarisch auf (B, D).

Der analysierte Bildbereich liegt an einer Stelle der Probenkammer, wo die Lösungen weit entfernt von der Membran gut durchmischt sind (Abbildung 2.3, C, Stern). Bei Biomaterialien ist anzunehmen, dass sie eine unregelmäßige Strukturierung über ihre Fläche besitzen. Folglich kann die Diffusionsgeschwindigkeit der BPB Moleküle lokale Unterschiede an der Membran aufweisen. Da der berechnete Diffusionskoeffizient jedoch einen Mittelwert über die Gesamtfläche des Biomaterials wiedergibt, würden direkt an der Membran aufgenommene Extinktionen die Messung verfälschen.

In der ersten Stunde der Diffusion wird alle 30 s der Helligkeitswert der BPB- und PBS Lösung gemessen und in einen Extinktionswert überführt. Im weiteren Verlauf werden im Abstand von 10 min die Messdaten erhoben. Nach 18-40 Stunden, wenn ein Farbausgleich der beiden Kammern zu beobachten ist (C), wird die Messreihe beendet.

Nun liegen die Extinktionswerte pro Zeitpunkt vor. Diese können über die Eichreihe zu Konzentrationswerten pro Zeitpunkt transformiert und in Gleichung (2.18) zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten eingesetzt werden. Je größer der Wert D in cm^2/s ist, desto mehr Diffusion findet durch das untersuchte Material statt.

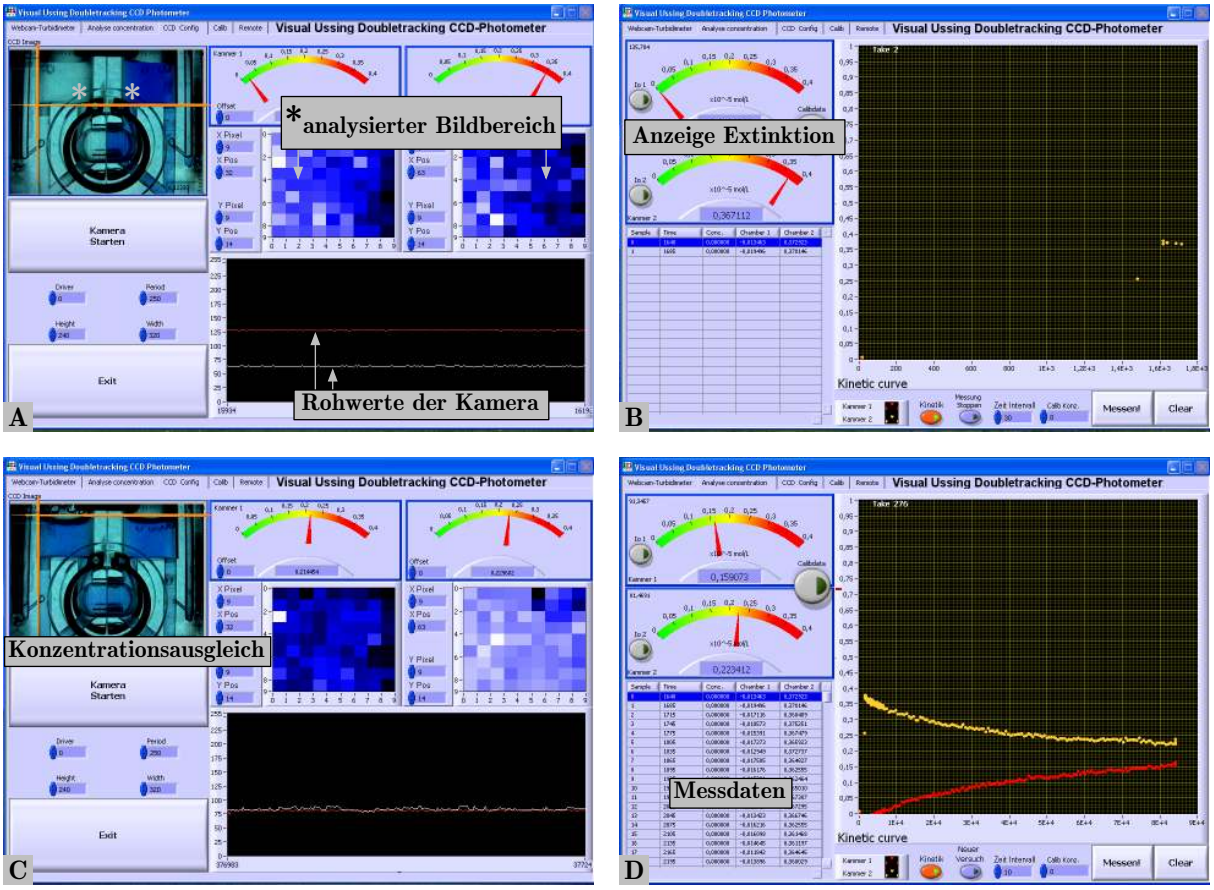


Abbildung 2.4: Bildschirmfoto der VUCCD *Software* zu Beginn (A,B) und am Ende einer Diffusionsmessung (C, D). Die beiden Kompartimente sind durch ein Biomaterial getrennt (A), durch das im Verlauf der Messung die Diffusion der BPB Moleküle bis zu einem Farbausgleich (C) stattfindet.

2.2.4.6 Dickenmessung der Materialien

Für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten ist die Kenntnis der Materialdicke eine Voraussetzung. Da das Verhältnis von Diffusionskoeffizient zur Dicke des Materials ($\frac{D}{d}$) in den exponentiellen Term des Fick'schen Gesetzes eingeht, ist eine möglichst genaue Dickenangabe von Vorteil.

Daher wird die Dicke der vier Biomaterialien Kollagen, Amnion, Seide und PLLA sowie der natürlichen humanen und bovinen Gewebe mit einer digitalen Bügelmessschraube im Fraunhofer Institut für Lasertechnik, Aachen ermittelt. Die verwendete Bügelmessschraube besitzt einen gerätetypischen Messfehler von bis zu $\pm$ 4 µm. Gemessen werden je Material drei verschiedene Proben aus teilweise unterschiedlichen Fertigungsauflagen. Von jedem einzelnen Materialstück werden sechs Messdaten erhoben.

2.2.5 ARPE-19 Zellkultur

Die humane ARPE-19 Zelllinie ist spontan aus retinalen Pigmentepithelzellen eines 19-jährigen männlichen Spenders hervorgegangen. In Kultur gehaltene ARPE-19 Zellen wachsen unter optimalen Bedingungen zu einem konfluenten einschichtigen Zellrasen. Ist die Konfluenz erreicht, teilen sich die Zellen durch Kontaktinhibition nicht weiter. Nach einer Stagnationsphase treten

die Zellen in eine Absterbephase ein. Um einerseits dieses Absterben zu verhindern und andererseits die Zellkultur zu vermehren, wird die ARPE-19 Zellkultur vor der Konfluenz auf mehrere Kulturgefäße passagiert. Das Passagieren der Zellen mit frischem erwärmtem Medium erfolgt alle 48 bzw. 72 Stunden. Zuerst wird die Zelldichte mikroskopisch festgestellt. Bei einer Zelldichte größer als Semikonfluenz, d.h. mehr als 150 Zellen pro mm^2, müssen die Zellen auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt werden.

Unter sterilen Bedingungen werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben wird. Während der 5-10 minütigen Inkubation bei 37 °C spaltet Trypsin die Peptidbindungen von Proteinen und sorgt so für die Ablösung der Zellen vom Untergrund und von benachbarten Zellen. Sobald sich die Zellen abrunden wird die Zellsuspension in das serumhaltige Medium überführt, um die Enzymaktivität es Trypsins zu stoppen und anschließend 10 min bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (Upm) zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation abgesaugt und das Zellpellet mit Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird je nach gewünschter Zelldichte oder in einer Verdünnung von 1:5 auf neue Kulturgefäße aufgeteilt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2-Gehalt, wobei dreimal pro Woche ein Mediumwechsel stattfindet.

2.2.6 Präparation boviner RPE und IPE Zellen

Die Rinderaugen werden von Bindegewebe befreit und in PBS auf Eis gesammelt. Zur Desinfektion werden die Augen 2 min in 70%igem Ethanol eingelegt. Anschließend werden sie in Ringerlösung unter der Sterilbank gelagert und die Präparation unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Auge wird am Limbus eröffnet und der vordere Augenabschnitt entlang der *ora serrata* vollständig entfernt (Abbildung 2.5, A und B).

Für die RPE Präparation wird der Glaskörper aus dem Bulbus entfernt (C), die Netzhaut mit Ringerlösung vom darunter liegenden Retinales Pigmentepithel (RPE) abgespült (D) und mit einem Skalpell Nr. 11 vom Sehnerv getrennt. Der Augenbecher wird in eine Petrischale gesetzt und zunächst mit Ringerlösung gefüllt, bis drei Bulbi präpariert sind. Dann wird die Ringerlösung durch 0,25%iges Trypsin / 0,02 g EDTA ersetzt (E) und die Gewebe bei 37 °C für 20 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die Enzymreaktion durch Absaugen der Trypsinlösung und Zugabe von serumhaltigem Medium (10% FBS) gestoppt. Vereinzelte RPE Zellen werden gewonnen, indem man mit einer Pasteurpipette im Augenbecher das RPE vorsichtig von der Bruch'schen Membran schabt, ohne die darunter gelegene Choroidea zu verletzen (F). Die Glaspipette wurde vorher im Bunsenbrenner umgebogen und geschliffenen. Die Zellsuspension aller Bulbi wird in einem 50 ml Röhrchen gesammelt.

Die Iris wird von der Hornhaut und Linse gelöst (G) und exakt ausgeschnitten, so dass kein Pigmentepithel des benachbarten Ciliarkörpers vorhanden ist (H). Bis zu sechs Irides werden mit Trypsin bedeckt und 20 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch serumhaltiges Medium gestoppt. Um IPE Zellen zu vereinzeln werden die Irides in der Petrischale ebenfalls mit einer gebogenen Pasteurpipette vorsichtig abgeschabt (I) und die dunkel getrübte Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen übertragen. Die Zellen aller Irides werden gesammelt.

Nach Vereinzelung beider Zelltypen mit einer 10 ml Pipette (J) wird eine Probe von ca. 20 µl für die Zellzählung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Während der Zellzählung werden die beiden Falconröhrchen 10 min bei 1.000 Upm zentrifugiert.

Anschließend wird der Überstand mit einer Pipette abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellzahl auf die gewünschte Zelldichte pro Milliliter eingestellt (Kapitel 2.2.7). Abschließend werden die Zellen in Kulturgefäßen (K) oder auf Biomaterialen ausgesät, welche mit einem Glasring beschwert sind (L). Die Kultivierung beider Zelltypen erfolgt in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2-Gehalt. Ein Mediumwechsel findet zweimal pro Woche statt, der erste erfolgt nach vier Kulturtagen.

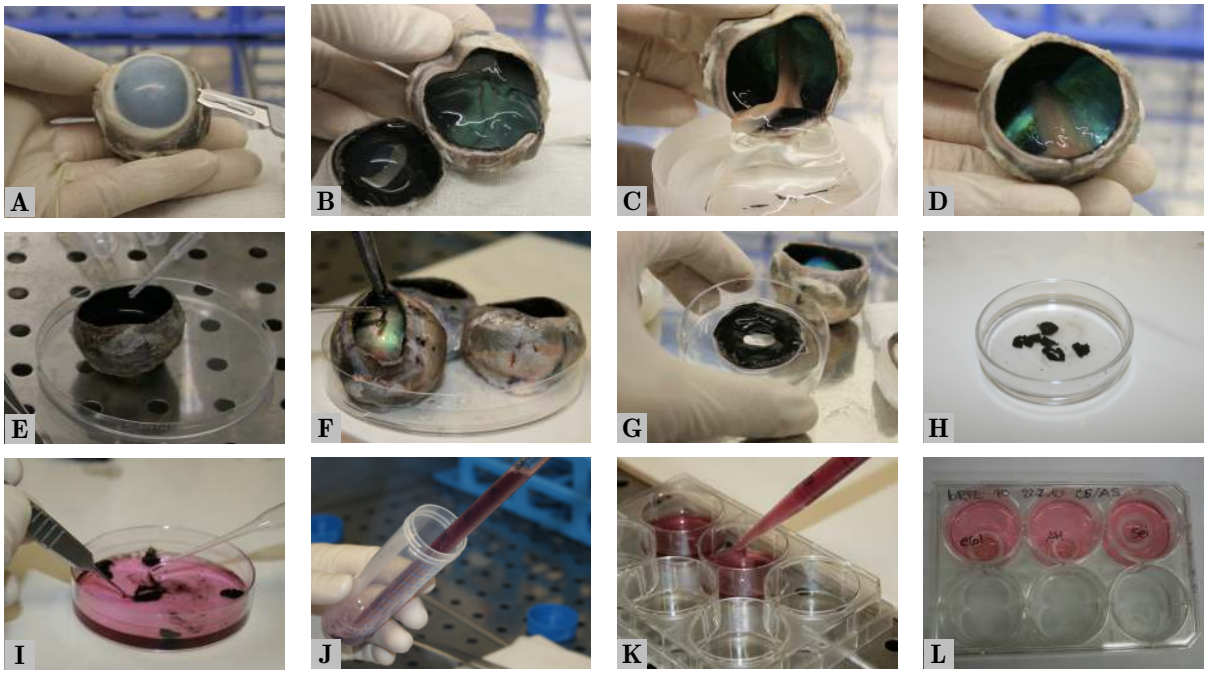


Abbildung 2.5: Zur Gewinnung von bovinen RPE und IPE Zellen werden die Augen in Vorder- und Hinterabschnitt getrennt (A, B). Nach Entfernung von Glaskörper und Netzhaut wird das RPE im Bulbus enzymatisch behandelt (C-E) und mit einem Glasschaber die Zellen von der Bruch'schen Membran abgelöst (F). Im Vorderabschnitt wird die Iris isoliert (G) und vom Ciliarkörper getrennt (H). Nach Trypsinierung werden die IPE Zellen durch Schaben gewonnen (I) und wie auch das RPE in Suspension vereinzelt (J). Die Zellen werden entweder in 6-Loch-Platten auf Plastik (K) oder auf Biomaterialien beschwert mit einem Glasring (L) ausgesät.

Nach der Präparation der RPE Zellen wird der Bulbus in zwei Hälften geteilt und der Gewebekomplex aus Bruch'scher Membran (BM) und Choroidea (CH) vorsichtig von der Sklera gelöst. Dieser wird anschließend mit der BM nach oben auf einen sterilen Objektträger aufgezogen und geglättet. Die Gewebe können in einer sterilen Petrischalen bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert werden. Die Präparation humaner Bruch'scher Membran-Choroidea erfolgt analog. Die humanen Spenderaugen werden von der Hornhautbank Aachen zur Verfügung gestellt. Ein Antrag zur Weitervermittlung humaner Gewebe und Gewebebestandteile zur Verwendung in der Forschung wurde durch das positive Votum der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen über den Forschungsantrag EK 066/05 der Hornhautbank Aachen genehmigt.

2.2.7 Zellzahlbestimmung zur definierten Aussaat

Um Wachstumseigenschaften von primären Zellen oder Zelllinien vergleichend untersuchen zu können, muss initial die gleiche Zellzahl pro Quadratzentimeter Fläche eines Kulturgefäßes oder auf Biomaterialien ausgesät werden.

Die Zellzahlbestimmung einer Suspension erfolgt mittels einer Neubauer Zählkammer. Zwanzig Mikroliter der entnommenen Probe aus der Suspension werden in einem Verhältnis von 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Durch diesen Farbstoff können tote Zellen von den vitalen unterschieden werden. Nach Befüllen der Zählkammer mit der Zellsuspension werden die vier äußeren Eckquadrate am Mikroskop in Doppelbestimmung ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl

N wird in folgende Formel zur Errechnung der Zellzahl pro Mikroliter N_1eingesetzt:

$$\frac{N}{A \cdot h \cdot VF} = \frac{N_1}{\mu l}, \tag{2.19}$$

mit A (8 mm) der Kammerfläche, h (0,1 mm) der Höhe der Zählkammer und dem Verdünnungsfaktor VF (1 : 2) der Zellsupension. Nach Multiplikation mit dem Faktor 1.000 und Einsetzen der oben genannten Größen ergibt sich die vorliegende Zellzahl N_1 pro ml:

$$\frac{N}{8} \cdot 20.000 = \frac{N_1}{\text{ml}} \tag{2.20}$$

Die gewünschte Zellzahl N_2 pro ml wird ausgehend von der gewünschten Zellzahl pro cm^2 ($N_{Fläche}$) und der Fläche A bzw. dem Fassungsvolumen V des Kulturgefäßes errechnet:

$$\frac{N_{Fläche}}{A \cdot V} = N_2 \tag{2.21}$$

Aus der Division von N_1 und N_2 pro ml folgt der Verdünnungsfaktor VF für die Zellaussaat:

$$\frac{N1}{N2} = VF \tag{2.22}$$

2.2.8 Markierung von Zellen

Für eine Anwendung des Zell-Folien-Konstrukts als Transplantat, ist es von Bedeutung, die transplantierten Zellen in der Histologie detektieren zu können. Deshalb wird nicht nur die Folie gefärbt, sondern auch die Zellen mit einem verträglichen Farbstoff markiert.

2.2.8.1 PKH26 Färbung der Zellmembran

PKH26 ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der aufgrund seiner Molekülstruktur mit langen aliphatischen Schwanz-Regionen gut in die Plasmamembran von lebenden Zellen integrieren kann (Exitation 551 nm, Emission 567 nm). Eine Supension von ARPE-19 oder primären RPE bzw. IPE Zellen in serumfreien Medium wird 5 min bei 400 Erdbeschleunigung (g) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Diluent C oder sterilem PBS resuspendiert. Dann wird eine 1 µmol/l PKH26 Färbelösung (ebenfalls in Diluent C) zu der Zellsuspension gegeben und sofort mit einer Pipette gemischt, um eine homogene Färbung der Zellen zu erreichen. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wird die Färbereaktion durch Zugabe des gleichen Volumens an FBS gestoppt. Nach einer Minute wird wiederum das gleiche Volumen an serumhaltigem Medium hinzugefügt und die Zellen 10 min bei 400 g zentrifugiert. Nach einem Waschschritt mit Medium wird das Zellpellet in der gewünschten Konzentration resuspendiert und die Zellen in Kulturgefäße ausgesät.

2.2.8.2 Hoechst 33342 Färbung der Zellkerne

Hoechst bindet spezifisch an die DNA im Zellkern und fluoresziert nach der Bindung im blauen Wellenlängen-Bereich (Exitation 350 nm, Emission 461 nm). Eine Lösung von 0,4 mg/ml Hoechst 33342 in sterilem PBS wird auf die Zellkultur gegeben und 6 min bei 37 °C inkubiert. Die mikroskopische Auswertung kann sofort im Anschluss durchgeführt werden. Der Farbstoff wird deutlich über eine Kulturdauer von etwa einer Woche im Zellkern gehalten.

2.2.9 Vitalfärbung

Die Färbung beruht auf der Tatsache, dass vitale Zellen eine intakte Plasmamembran besitzen, wogegen bei nekrotischen oder toten Zellen die Membran permeabel wird. FDA bindet an vitale Zellen und wird von membranständigen Esterasen umgesetzt, wodurch es zu einer grünen Fluoreszenz kommt. Bei nekrotischen oder toten Zellen kann die zweite Färbekomponente Ethidiumbromid durch die Zellmembran diffundieren und in die DNA im Zellkern interkalieren. Diese Kerne fluoreszieren unter dem Mikroskop rot und erreichen so eine klare Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen. Mittels Vitalfärbung können die Kriterien Zellvitalität bzw. Zelltod, Zellwachstum, Zelldichte und Morphologie auch im Vergleich unterschiedlicher Kulturzeitpunkte beurteilt werden.

ARPE-19 Zellen werden für Vitalitätstests in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm^2 in einem Dreifachansatz auf den verschiedenen Materialien und Glasplättchen als Kontrolle ausgesät und sechs Tage in Kultur gehalten. Nach 24 und 48 Stunden sowie nach sechs Tagen werden die Zellen mittels FDA und Ethidiumbromid angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Für Vitalfärbungen an primären bovinen RPE und IPE Zellen werden diese im Doppelansatz direkt nach der Präparation in einer Dichte von 100.000 Zellen/cm^2 auf den Biomaterialien ausgesät und über einen Zeitraum von vier Wochen dokumentiert. Die Vitalfärbung erfolgt an Tag 14, 21 und 28 im Kulturverlauf. Ein Mediumwechsel findet zweimal pro Woche statt, ebenso die Durchlichtmikroskopie der Zellen. Nach einer Kulturdauer von 14 Tagen wird die Serumkonzentration im Medium von 10% auf 1% reduziert, um Stoffwechselprozesse der Zellen zu verlangsamen und Hyperkonfluenz der Zellen zu vermeiden.

Sofort nach Zugabe der Färbelösung erfolgt die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahmen von mindestens sieben Gesichtsfeldern in 100-facher bzw. zwei Aufnahmen in 50-facher Vergößerung.

2.2.10 TER Messung

Mittels dieser Messung ist es möglich, den transepithelialen Widerstand (TER) von geschlossenen Zellverbänden auf den verschiedenen Biomaterialien zu ermitteln. ARPE-19 Zellen werden auf den Materialien ausgesät und in einem Kulturverlauf von 28 Tagen die elektrischen Widerstände an Tag 2, 7, 12, 14, 21 und 28 gemessen. Als Standard werden Zellen in Kultureinsätzen (sog. *Inserts*) auf Polyestermembranen mit $0,4$ µm Porengröße mitgeführt. Zur Herstellung der Biomaterial-*Inserts* werden die Membranen mit einem Skalpell entfernt und anschließend ein Folienstück zusammen mit einer Lage Gaze zur Stabilisierung und einem umschließenden Gummiring in die Einsätze eingespannt (siehe Abbildung 2.6, A-H). Die Messkammer wird mit 70% Ethanol gereinigt und das Messgerät kalibriert. Gonzalez-Mariscal *et al.* publizierten, dass Temperaturunterschiede von nur wenigen Grad Celsius zu starken Schwankungen der Messwerte führen können [González-Mariscal *et al.*, 1984]. Daher findet die Widerstandsmessung auf einer Wärmeplatte bei 37 °C statt (I).

Vor jeder Messung, die unter sterilen Bedingungen erfolgt, wird das Medium durch 500 µl frisches Medium ersetzt, um im *Insert* gleiche Volumina zu gewährleisten und Luftblasenbildung zu vermeiden. Zunächst werden die Material-*Inserts* ohne Zellen gemessen. Diese Werte dienen als Kontrolle und sollten bei jeder Messung nahezu identisch sein. Das mit Medium befüllte *Insert* wird in die Kammer gestellt, in der 2 ml Medium vorliegen (J, K). Im Boden der Kammer befindet sich die erste Messelektrode. Die Kammer wird abschließend mit einem Deckel, der die zweite Elektrode enthält, verschlossen (L) und die Messung mit dem EVOM-Gerät kann erfolgen. Die Messungen wird dreimal je Probe durchgeführt und erfolgt ebenfalls im dreifachen Ansatz pro Material, sowie in drei individuellen Versuchsreihen. Die ARPE-19 Zellen werden in einer initialen Dichte von 15.000 Zellen/cm^2 ausgesät. Um die Morpholgie und Zelldichte während der

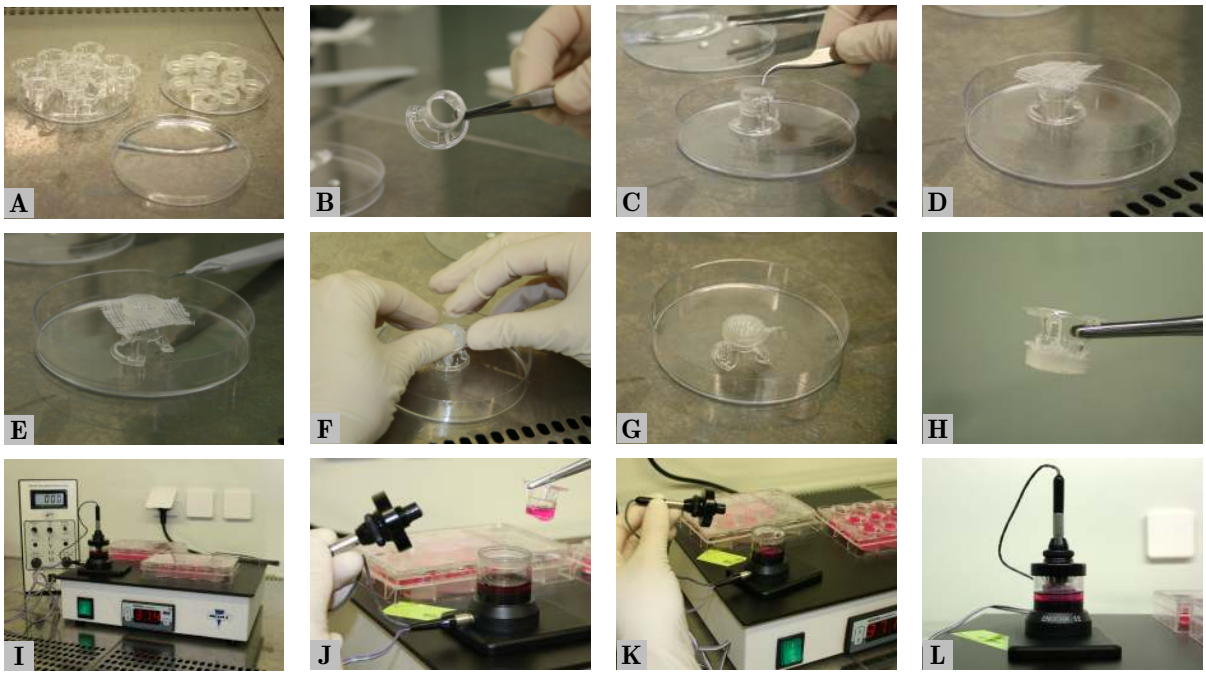


Abbildung 2.6: Herstellung von Biomaterial-*Inserts*. Aus Zellkultur*inserts* (A) wird die Membran ausgeschnitten (B). Ein Biomaterial (C) wird zusammen mit einem Sück Gaze (D) und einem Gummiring (E) um das *Insert* gestülpt (F-H). Im Messaufbau (I) wird ein *Insert* in die Messkammer gesetzt (J, K) und mittels EVOM-Gerät die Messung in der geschlossenen Kammer (L) ausgelöst.

Kultur überprüfen zu können, werden auch Kontrollen in 12-Loch-Platten mitgeführt.

Die erhaltenen Messwerte (in *Ohm*) je Probe werden gemittelt. Um den tatsächlichen Widerstandswert der Zellen zu ermitteln, werden die Kontrollwerte ohne Zellen von den Mittelwerten der drei Messungen je Probe subtrahiert. Dieser Wert wird mit der Fläche der *Inserts* bzw. der Biomaterialien von $1,12\,\mathrm{cm}^2$ multipliziert. Das Ergebnis ist der Widerstand bezogen auf diese Fläche und wird in $\Omega\mathrm{cm}^2$ angegeben. Da sich der Widerstand antiproportional zur Fläche verhält, wird er *nicht* mit der Einheit (Ω/cm^2) beschrieben. Von dem Dreifachansatz je Material fließen jeweils die beiden besten Proben mit in die Auswertung ein. Die Werte aus drei unabhängigen Versuchen werden in der Gesamtauswertung folglich aus $n = 6$ Proben gemittelt.

2.2.11 Immunfluoreszenz von Zellkulturen

Die Immunhistologie ermöglicht den qualitativen Nachweis der Expression von Proteinen. Markermoleküle auf und in Zellen können detektiert und ihre Verteilung im Gewebe veranschaulicht werden. Hierfür wird ein primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch an ein Antigen auf der Zielzelle bindet. Um eine Signalamplifizierung zu erreichen, binden anschließend mehrere sekundäre Antikörper, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reportersubstrat konjugiert sind, an den primären Antikörper.

2.2.11.1 Fixierung von Zellkulturen

Vor immunhistochemischen Färbungen muss die Zellkultur fixiert werden, damit der *status quo* der Zellen und ihrer Verbände konserviert wird und autolytische Prozesse, die Epitopstrukturen verändern, unterbunden werden. Fixative sind meist Aldehyde, welche kreuzvernetzend wirken. Proteine werden miteinander verbunden und das Zytoplasma in ein Gel verwandelt, so

dass auch lösliche Proteine in der Zelle zurückgehalten werden. Die Zellkulturen auf Biomaterialien werden zweimal 5 min mit warmem PBS gewaschen und anschließend 30 min in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur oder mit kaltem Methanol auf Eis fixiert. Der Vorgang wird durch drei Waschschritte zu je 5 min mit PBS gestoppt.

2.2.11.2 Färbeprotokoll

Nach der Fixierung beginnt das Färbeprotokoll mit der Permeabilisierung der Zellmembran. Hierfür kann in den ersten drei Waschschritten zum PBS 0,1% Triton X-100 zugesetzt werden. Die eigentliche Permeabilisierung erfolgt 30 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden unspezifische Bindestellen 60 min in 5% BSA in PBS geblockt. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 (Cytokeratin und ZO-1) bzw. 1:50 (RPE65) in 0,8% BSA in PBS über Nacht bei 4 °C. Als Negativkontrolle werden Kulturen mitgeführt, bei denen der Erstantikörper durch PBS substituiert ist. Am nächsten Tag werden die Zellen 4x 10 min mit PBS gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper in PBS gelöst aufgetragen wird. Dessen Spezies ist gegen die des jeweiligen Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa 488)gekoppelt. Die Inkubation erfolgt 60 min im Dunkeln bei RT. Anschließend folgen drei Waschschritte von jeweils 10 min mit PBS, wobei im ersten Waschschritt dem PBS 0,5% Triton X-100 zugesetzt ist. Danach werden die Zellkerne mit DAPI gefärbt, einem Farbstoff, der in die DNA interkaliert und blau fluoresziert. Dieser wird auf die Zellen gegeben und nach 10 min überschüssiger Farbstoff mit PBS ausgewaschen.

Abschließend werden die Kulturen mit dem Eindeckmedium *Vectashield* überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt. Die Auswertung erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Zur Markierung von Aktinfilamenten mittels Phalloidin wird ein gesondertes Protokoll angewendet. Die Zellen werden in warmem PBS 2x gewaschen und mit 4% PFA 20 min bei RT fixiert. Es folgen drei Waschschritte a 5 min , 1x 5 min eiskaltes Aceton und wieder 3x 5 min PBS. Die Zellen werden 10 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert, dann 2x 5 min mit PBS gewaschen und 20 min mit 1% BSA in PBS geblockt. Die Inkubation des Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers erfolgt 20 min im Dunkeln und bei RT in einer Verdünnung von 25 µg/ml in PBS. Nach 3x 5 min Waschen mit PBS folgt die Kernfärbung wie zuvor beschrieben.

Die Färbungen auf Kollagenmembranen werden mittels konfokaler Mikroskopie von Prof. Gerhard Müller-Newen im Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Aachen (SFB 542, *core-facility* konfokale *Laser-scanning* Mikroskopie) dokumentiert. Daher unterscheiden sich diese Aufnahmen in der Vergrößerung von Fluoreszenzaufnahmen auf den anderen Biomaterialien. Aufgrund der Filterzusammensetzung im Mikroskop werden die Zellkerne für die Konfokal-Mikroskopie mittels Propidiumiodid statt DAPI gefärbt.

PLLA wird für die Immunhistochemie nicht als Nanofaservlies verwendet, sondern in Form einer PLLA Beschichtung auf Deckgläschen. Da sich in der Zellkultur zeigt, dass die Zellen auf den Nanofasern zu wenig ausgebreitet sind, um Immunfärbungen eindeutig darstellen zu können (vgl. Kapitel 3.3.3), soll hier der prinzipielle Nachweis der Proteinexpression auf Polylactid erbracht werden.

2.2.12 Herstellung von Gefrierschnitten

Um die Zelldichte auf den Biomaterialien im Querschnitt zu dokumentieren, werden von den Kulturen Dünnschnitte angefertigt. Anders als in Paraffinschnitten ist der fluoreszierende Membranfarbstoff PKH26 in Gefrierschnitten weiterhin detektierbar.

Nach der Fixierung (siehe Kapitel 2.2.11.1) werden die Kulturen dreimal 10 min mit PBS

gewaschen und anschließend in 25%ige Saccharoselösung eingebettet. Am nächsten Tag wird ein Stück der Zell*sheets* am Kryostat geschnitten. Um transversale Schnitte zu erhalten wird zunächst ein 1 cm hoher Sockel aus Einbettmedium auf den Objektträgertisch aufgefroren. Dieser wird anschließend mit einer Rasierklinge vertikal halbiert, so dass eine plane Fläche entsteht, die senkrecht zum Objektträgertisch orientiert ist. Die Probe wird dann zusammen mit einem Stück Nitrozellulosemembran als Träger auf die plane Fläche übertragen und mit Einbettmedium überschichtet. Die Dicke der Querschnitte beträgt $5 - 6$ µm bei einer Objekttemperatur von -29 °C und einer Boxtemperatur von -30 °C. Die Schnitte werden vom Messer mit einem Objektträger aufgenommen, der mit 2%iger Gelatine beschichtet ist, um die Adhäsion der Schnitte zu verbessern. Über Nacht werden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet und abschießend bei -20 °C gelagert.

2.2.13 Genexpressionsanalyse

2.2.13.1 Gesamt-RNA Isolation

Ausgangsmaterial für die RNA Isolierung sind primäre bovine RPE und IPE Zellen, die 14 Tage auf Biomaterialien oder Plastik kultiviert wurden. Die Isolierung der RNA erfolgt bei Raumtemperatur mit Hilfe des *RNeasy Micro Kits* von Qiagen. Die bis zur Konfluenz gewachsenen Zellen werden in den 6-Loch Platten nicht trypsiniert, sondern in den Schalen lysiert. Hierzu wird das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 200 µl RLT-Puffer plus β-Mercaptoethanol (10 µl/ml Puffer) überschichtet. Mit einem Zellschaber werden die Zellen vom Boden abgelöst, die Suspension in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt und 15 s *gevortext*. Die Zell*sheets* werden nach Absaugen des Mediums zu je 4-6 Stück in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt, welches RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol enthält, und ebenfalls *gevortext*. Die PLLA Faservliese werden, nachdem der Rand des *cell crowns* von dem *Insert* entfernt wurde, vorsichtig von der Lage Gaze befreit. Die Suspension der Kontrollzellen auf Plastik bzw. der Zellen mit dem Folienmaterial wird anschließend auf *QIAshredder spin columns* überführt und 2 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das im Durchfluss befindliche Zelllysat wird mit dem gleichen Volumen an 70%igem Ethanol gemischt, auf *RNeasy spin* Säulen übertragen und 15 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Homogenat in der Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Darauf folgt ein Inkubationsschritt von 15 min mit *DNase*, um mögliche DNA Reste zu entfernen. Hierzu werden pro Säule 10 µl *DNase* Stammlösung mit 70 µl RDD Puffer gemischt und auf die Säule gegeben. Anschließend erfolgt ein Waschschritt mit 350 µl RW1 Puffer für 15 s bei 10.000 Upm. Dann werden zwei weitere Waschschritte mit 500 µl RPE-Puffer (15 s) bzw. 500 µl 80%igem Ethanol (2 min) durchgeführt. Die Säule wird auf ein neues *collection tube* gesetzt und ohne Zugabe einer neuen Flüssigkeit mit offenem Deckel 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert, damit restliches Ethanol vollständig entweichen kann.

Die Elution der RNA erfolgt mit 14 µl *RNase* freiem Wasser bei 14.000 Upm für 1 min. Nach Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wird die RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.13.2 Bestimmung von Nukleinsäure Konzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen kann mittels eines *Nanodrop*™ Spektralphotometers bestimmt werden.

Für RNA Proben wird das Gerät zunächst mit einem 2 µl Tropfen *RNase* freiem Wasser kalibriert und anschließend die Messkonstante 40,00 eingestellt. Die Bestimmung des Konzentrationsgehalts erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur RNA Messung wird ein Tropfen von $1,5$ µl der jeweiligen Gesamt-RNA benötigt. Die Konzentration wird in ng/µl angegeben. Der Quotient der optischen Dichten gemessen bei 260 nm / 280 nm ermöglicht Aussagen über die Reinheit der RNA. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 2,1 liegen. Auch die

Konzentration der *copy*DNA (cDNA) wird mittels *Nanodrop* gemessen. Hier wird die Konstante 30,00 für einsträngige Nukleinsäuren eingestellt. Der weitere Messablauf ist analog zur RNA.

2.2.13.3 *Reverse Transkription* Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben von RNA in cDNA. Für die RT Reaktion wird die unter Kapitel 2.2.13.1 isolierte RNA verwendet. Aus der gesamten zellulären RNA wird nur *messenger* RNA (mRNA) in DNA umgeschrieben. Dies geschieht mit Hilfe von Oligo-(dT_{15})-*Primern*, welche an der Poly(A)-Sequenz ansetzen, die eukaryotische mRNA an ihrem 3´-Ende trägt. Zusätzlich werden kurze *Primer*fragmente, sog. *Random Primer* in den Reaktionsansatz gegeben. Diese Hexamere können entlang der gesamten mRNA binden und gewährleisten so, dass auch Gene abgelesen werden, die weit entfernt vom Poly(A)-Schwanz liegen.

Eine RNA-abhängige DNA Polymerase überschreibt die mRNA in die komplementäre DNA Sequenz. Um ein Endvolumen von 20 µl zu erhalten, wird eine definierte RNA Menge von $0,5$ µg/µl zunächst *ad* $8,9$ µl mit sterilem Wasser aufgefüllt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Ein *Mastermix* bestehend aus folgenden Komponenten wird zur RNA hinzugegeben:

$4,0$ µl	$MgCl_2$ (25 mmol/l)
$2,0$ µl	10x Reverse Transkriptionspuffer
$2,0$ µl	dNTP-Mix (10 mmol/l)
$0,5$ µl	RNasin
$1,0$ µl	Oligo-(dT15)-*Primer*
$1,0$ µl	*Random Primer*
$0,6$ µl	AMV Reverse Transkriptase

Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur, welche die Anlagerung der *Random Primer* ermöglicht, wird der Reaktionsansatz eine Stunde bei 42 °C und 5 min bei 95 °C inkubiert. Abschließend wird der Reaktionsansatz erneut mit sterilem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl und damit auf eine Konzentration von 10 ng/µl der ursprünglich eingesetzten RNA gebracht. Nach der Konzentrationsbestimmung der cDNA Proben werden diese bis zum Einsatz in der PCR bei −20 °C gelagert.

2.2.13.4 Quantitative *Real-Time* Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative *real-time* PCR ermöglicht die Echtzeitverfolgung der PCR und die Quantifizierung der amplifizierten Genfragmente. Verwendet wird das *LightCycler* System in Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I*, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der entstehenden PCR Produkte zu und ermöglicht so die Quantifizierung der Zielsequenz. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt wird als *Crossing Point* (CP) oder *Cycle Threshold* (CT) angegeben [Pfaffl, 2001]. Bei jeder PCR werden die beiden Haushaltsgene Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) mitgeführt. Zellen exprimieren Haushaltsgene konstitutiv und unabhängig von experimentellen Behandlungen, so dass sie als Kontrolle und für die Auswertung als Bezug dienen.

Die relative Quantifizierung beschreibt Änderungen in der Expression des Zielgens bezogen auf eine Referenzgruppe [Livak and Schmittgen, 2001]. Durch die sog. $\Delta\Delta CT$ Methode wird die Genexpression der Zellen auf Biomaterialien auf die Genexpression von Zellen auf Plastik bezogen. Zunächst aber wird die Expression des Zielgens pro Material mit einem Haushaltsgen als interne Referenz normalisiert, um Variationen zwischen verschiedenen PCR Läufen zu kompensieren. Der CP Wert des Referenzgens wird hierfür von dem CP Wert des Zielgens subtrahiert, so

dass man den ΔCP Wert erhält. Der ΔCP Wert der Kontrollzellen auf Plastik wird anschließend vom ΔCP Wert der jeweiligen Materialgruppe subtrahiert [Livak and Schmittgen, 2001]. Da die unterschiedliche Genexpression als x-fache Expression angegeben wird, ergibt sich das Verhältnis (*Ratio*) aus folgender Gleichung:

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta CT} \tag{2.23}$$

Diese Berechnung geht davon aus, dass sich in der exponentiellen Phase der PCR die Anzahl der Zielsequenz mit jedem PCR Zyklus verdoppelt. Ein Wert > 1 stellt somit eine Hochregulation des Gens bei der Kultivierung auf einem der Biomaterialien dar, ein Wert < 1 eine verminderte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen auf Plastik.

Die hergestellte cDNA wird für die Gene PEDF, KRT8, ZO-1 und CathD mit 2 µl, für RPE65, CRALBP, CD86 und VEGF mit 3 µl im Reaktionsansatz eingesetzt. Pro Gen wird ein *Mastermix* aus folgenden Komponenten hergestellt:

11,6 bzw. 10, 6 µl	RNase freies Wasser
2, 4 µl	4 MillimolproLiter(mmol/l) $MgCl_2$
1, 0 µl	*forward Primer*
1, 0 µl	*reverse Primer*
2, 0 µl	*SYBR-Green I FastStart*

Die *Primer* werden in etablierten Verdünnungen von 1:10 und 1:50 eingesetzt (siehe Tabelle 2.1.9). Die cDNA wird in die Kapillaren vorgelegt und mit 18 µl bzw. 17 µl *Mastermix* aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation von einer Minute bei 200 Upm werden die Kapillaren in das *LightCycler* Karussell gestellt. Negativkontrollen (NTC) mit dem *Mastermix* und Wasser an Stelle der cDNA werden mitgeführt, um den Zyklus mit beginnender unspezifischer exponentieller Amplifikation zu ermitteln. Die PCR läuft mit 60 Zyklen nach folgendem Schema:

Denaturierung		95 °C	10 min	
PCR	Denaturierung	95 °C	10 s	
	Anlagerung der *Primer*	60 °C	8 s	
	Elongation	72 °C	15 s	
Schmelzkurve		95 °C	0 s	20, 0 °C/s
		65 °C	15 s	20, 0 °C/s
		95 °C	0 s	0, 1 °C/s
Kühlung		40 °C	30 s	

Die *Primer* für CRALBP und CD86 benötigen im Gegensatz zu allen anderen Zielgenen eine Anlagerungstemperatur von 62 °C für sieben Sekunden.

Im Anschluss an den letzten PCR Zyklus wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR Produkte zu überprüfen. Dabei werden die doppelsträngigen Produkte kontinuierlich mit einer Übergangsrate von 20 °C/s auf 95 °C aufgeschmolzen. Durch das Freisetzen des Fluoreszenzfarbstoffes entsteht ein spezifischer Scheitelpunkt für das Zielgen. *Primerdimere* oder ungewollte PCR-Fragmente würden zusätzliche *Peaks* mit einem geringeren Schmelzpunkt verursachen [Holzapfel *et al.*, 2007].

Die *Intra-Assay* Präzision, die zwischen verschiedenen Reaktionsansätzen in einem PCR Lauf durch zum Beispiel ungenaue Pipettiervolumina beeinträchtigt sein könnte, wird in zehn Replikaten einer cDNA Probe innerhalb eines PCR Ansatzes evaluiert. Hierfür wird die cDNA aus

einer Probe kultivierter bIPE Zellen auf Plastik hergestellt und mit den *Primern* für HPRT1 und KRT8 verwendet. Die RT Reaktion wird in einem halben Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt und anschließend in der PCR 2 µl cDNA eingesetzt. Um die Präzision zwischen PCR Experimenten an verschiedenen Tagen zu überprüfen (*inter-assay*), werden die Haushaltsgene bei jedem einzelnen Lauf mitgeführt.

Die PCR Effizienz ist ein Begriff, der die Qualität der Polymerase Kettenreaktion beschreibt. Diese wird mittels einer Verdünnungsreihe einer cDNA Probe kultivierter bIPE Zellen durchgeführt. Verdünnungen um jeweils die Hälfte von 1:1 (10 ng) bis hin zu 1:256 (39, 10 pg) der ursprünglichen Gesamt-RNA werden in einer PCR für die beiden Haushaltsgene HPRT1 und GAPDH eingesetzt. Die erhaltenen CP Werte werden graphisch dargestellt und mittels Regressionsgerade der Korrelationskoeffizient ermittelt. Um eine hohe Präzision der Polymeraseaktivität darzulegen, sollte dieser Koeffizient möglichst nah an 1,0 liegen, was einer Effizienz von 100% entspricht.

2.2.14 *In vivo* Transplantation am Kaninchenauge

Die operativen Eingriffe am Kaninchen werden von Univ. Prof. Dr. Gabriele Thumann ausgeführt. Zur Narkose der Tiere werden gewichtsadaptierte Dosen von je 50-70 mg/kg Körpergewicht an 10%igem Ketamin und 4-5 mg/kg an 2%igem Xylazin verwendet und intramuskulär in den Oberschenkel verabreicht. Nach Ablauf von 30 min kann die Anästhesie bei Bedarf um jeweils 20 min mit der Hälfte der Anfangsdosis verlängert werden. Unmittelbar vor OP-Beginn werden zur lokalen Betäubung 0,5%-Proparakain-Tropfen appliziert und Methocel als Hornhautschutz aufgetropft. Das Auge wird auf Lidreflexe durch Berührung und Licht überprüft. Das nicht operierte Auge wird als Schutz vor Austrocknung mit Leukoplast abgeklebt. Der chirurgische Eingriff wird mit Hilfe eines Operationsmikroskopes durchgeführt.

2.2.14.1 Subkonjunktivale Transplantation

Die subkonjunktivale Transplantation von verschiedenen Biomaterialien unter die Bindehaut des Auges dient der Beurteilung der *in vivo* Bioverträglichkeit und des Degradationsverhaltens der Materialien. Die Bindehaut ist ein gut durchblutetes Gewebe, das die Sklera bis zum Beginn der Cornea überzieht. Aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität werden eventuell auftretende Entzündungsreaktionen nach der Transplantation schnell sichtbar. Darüber hinaus wird anhand der Implantationstechnik untersucht, ob sich das Material aufgrund seiner Handhabung und Eigenstabilität als Transplantat eignet.

Bei der subkonjunktivalen Transplantation werden zwei Folienstücke pro Auge im anterioren Sklerabereich mit einem Abstand von etwa 3 mm zum Limbus unter der Bindehaut platziert. Die Lokalisation des Implantats ist stets gleich mit einem superioren Implantat in 12 Uhr Position unterhalb des Oberlides und einem temporalen Implantat in 9 Uhr Position am rechten Auge und entsprechend 3 Uhr am linken Auge. Nachdem das Auge mit zwei skleralen Pinzetten protrusioniert ist, wird mit einer Vannasschere die Bindehaut schlitzförmig radiär eröffnet und eine Tasche gebildet (Abbildung 2.7, A). Der Stern zeigt hier das natürliche Erscheinungsbild eines Augenmuskels an und ist keine Reizung durch die Operation. Die Folie wird dann mittels einer Pinzette eingeführt und geglättet (B). Anschließend wird die Bindehaut zum Wundverschluss und um einem Verlust der Folie vorzubeugen mit einem 7-0-Polyglykolsäure-Faden adaptiert (C). Das Operationsergebnis und die Lage der Folie wird mittels Videoaufnahme dokumentiert (D).

Direkt nach der Operation werden Isoptomax-Augentropfen und Methocel appliziert. Im Rahmen der Nachsorge werden die Augen im Abstand von einigen Tagen oder bis zu zwei Wochen unter Narkose mit Hilfe des OP-Mikroskops auf Entzündungsreaktionen untersucht.

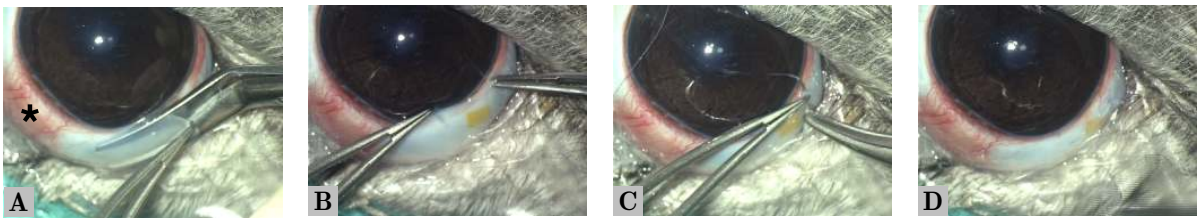


Abbildung 2.7: Subkonjunktivale Transplantation eines DTAF gefärbten Biomaterials. Die Bindehaut wird eröffnet und eine Tasche gebildet (A), in der die Membran platziert wird (B). Nach dem Wundverschluss (C) wird das Operationsergebnis dokumentiert (D). Der in (A) gezeigte Stern markiert einen Augenmuskel und ist keine Entzündung.

2.2.14.2 Subretinale Transplantation

Mit der subretinalen Transplantation wird geprüft, ob eine exakte Plazierung der Biomaterialien im subretinalen Spalt zwischen Netzhaut und RPE möglich ist. Des Weiteren werden durch diese Operation Auswirkungen der Materialien auf die Netzhautstrukturen und die Toleranz im subretinalen Raum untersucht.

Für die subretinale Transplantation erfolgt zusätzlich zu der beschriebenen Narkose eine Erweiterung der Pupille (Mydriasis) durch topische Anwendung von 2,5%-Phenylephrin-Tropfen und die Applikation von Methocel als Hornhautschutz.

In der Regel wird das rechte Auge operiert. Zuerst werden Traktionsnähte aus 3-0 Mersilene in die geraden Augenmuskeln eingenäht, um die Protrusion des Auges zu unterstützen. Mittels Sklerotomie im Bereich der *pars plana* wird auf 11 Uhr Position eine Infusionskanüle zur Infusion von NaCl 0,9% mit Heparin- und Dexamethasonzusatz in den Bulbus eingeführt und mit 7-0 Polyglykolsäure-Fäden befestigt. Zur Sicht auf den Augenhintergrund wird eine Kilplinse auf das mit Methocel befeuchtete Auge aufgelegt. Eine weitere Sklerotomie auf 4 Uhr Position dient dem Einbringen der Mikroinstrumente. Mit Hilfe eines *Cutter* wird eine partielle Glaskörperentfernung (Vitrektomie) im Bereich oberhalb des Nervenfaserstranges durchgeführt (Abbildung 2.8, A) und gleichzeitig die Infusion über das OMNI-Gerät eingeleitet, welche den Augeninnendruck aufrechterhält. Anschließend wird temporal zum Sehnerv mit einer 36-Gauge-Nadel NaCl Lösung unter die Netzhaut injiziert (B), was zu einer artifiziellen subretinalen Blase führt (grauer Kreis). Nun kann eine Retinotomie mit einer Mikroschere durchgeführt werden (C). Durch diesen Einschnitt in die Netzhaut erfolgt die Transplantation von einem ca. 2,5 x 2,5 mm großen DTAF-gefärbten Folienstück, welches von einer Mikropinzette gehalten wird (D und E). Eine temporäre Endotamponade mit Perfluorcarbon (PFCL) verhindert den Reflux von Flüssigkeit und Folienstück durch die Retinotomie (F, graue Ellipse), so dass postoperativ die Folie glatt unterhalb der Netzhaut liegen bleibt (G). Abschließend werden die Stichkanäle mit Hilfe der bereits zu Beginn angelegten Polyglykolsäure-Fäden verschlossen (H) und die Linse sowie die Traktionsnähte entfernt.

Eine Nachsorge findet wie auch nach der subkonjunktivalen OP statt. Hierzu werden die Tiere in Kurznarkose mit Mydriasis versetzt und die Augen unter dem OP-Mikroskop funduskopisch beurteilt.

Nach einem Beobachtungszeitraum von einem Tag bis zu mehreren Monaten, erfolgt die schmerzlose Tötung der Tiere durch eine Überdosis Barbiturat und die Enukleation der Augen.

2.2.15 Histologische Aufarbeitung der Kaninchenaugen

Nach der Enukleation der Augen werden diese drei Tage bei 4°C in 3,7%igem Formalin fixiert. Anschließend werden die Augen in PBS überführt und makroskopisch dokumentiert. Hierbei

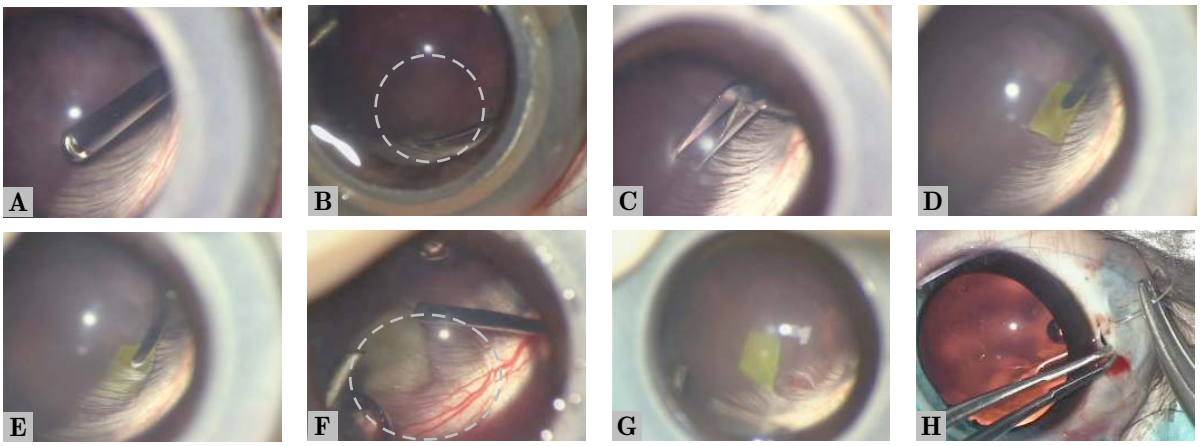


Abbildung 2.8: Subretinale Transplantation eines DTAF gefärbten Biomaterials. Nach einer partiellen Vitrektomie (A) wird NaCl-Lösung unter die Netzhaut injiziert, um diese lokal abzuheben (B, Kreis). Eine Retinotomie eröffnet die Netzhaut (C), so dass das Material subretinal platziert werden kann (D, E). Mittels schwerer Flüssigkeit (F, Ellipse) wird die Retina wieder angelegt. Nach Dokumentation der Lage des Implantates (G) werden final die Zugänge vernäht (H).

wird das Transplantationsareal (subkonjunktival oder subretinal) aus dem Bulbus mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Gewebeprobe in die mit Filterpapier ausgelegten Einbettkassetten überführt.

Das Gewebe wird über Nacht in einem Entwässerungsautomat über eine ansteigende Alkoholreihe (v/v in H_2O dest.) aus Ethanol und Xylol entwässert und in flüssigem Paraffin aufgenommen. In einer Einbettvorrichung werden anschließend die Gewebeproben aus den Kassetten in Metallschälchen überführt und in Paraffin eingelegt. Dieses erstarrt unter Kühlung zu einem festen Block, der anschließend am Schlittenbahnmikrotom geschnitten oder bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Um Schnitte von $3 - 5$ µm Dicke herzustellen, werden die Paraffinblöcke in ein Schlittenbahnmikrotom eingespannt und die erhaltenen Schnitte auf Superfrost Objektträger aufgezogen.

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops kann das DTAF gefärbte Material in den nativen Paraffinschnitten lokalisiert werden. Für die histologische Beurteilung werden je Transplantat 3-4 Objektträger mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

2.2.15.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Färbung ist vor allem für die Anfärbung von Zellkernen geeignet. In saurem Milieu bindet das positiv geladene Hämalaun an Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Durch eine Verschiebung des pH-Wertes in den neutralen Bereich, was durch Spülen mit Leitungswasser erreicht wird, färben sich Zellkerne im Präparat violett bis blau. Mittels Eosin werden zytoplasmatische Bestandteile und Kollagen in Rosa- bis Rottönen gegengefärbt.

Vor einer Färbung der Schnitte muss das Paraffin von den Objektträgern entfernt werden. Dazu werden sie dreimal 10 min in 100% Xylol eingetaucht. Anschließend werden die Gewebe durch Lösungen abnehmender Ethanolkonzentrationen (v/v in H_2O dest.) geführt, beginnend mit 100%igem Ethanol (zweimal 10 min) über einmalig 10 min 96%igen und einmal 70%igen Ethanol. Um den Alkohol aus den Schnitten zu entfernen, werden diese abschließend dreimal 5 min in destilliertem Wasser gewaschen.

Die HE Färbung erfolgt bei Raumtemperatur, die Objektträger werden hierfür in ein jeweils neues Gefäß eingetaucht:

Mayer's Hämalaun	10 min
warmes Leitungswasser	mehrmals spülen und 10 min wässern
0,1% Eosin in H_2O dest.	10 min
H_2O dest.	kurz spülen
70% Ethanol	5 min
96% Ethanol	3 × kurz eintauchen
100% Ethanol	3 × kurz eintauchen
100% Ethanol	3 × kurz eintauchen
100% Xylol	5 min
100% Xylol	5 min
100% Xylol	5 min

Nach der Färbung werden die Schnitte mit einem Medium auf Xylolbasis und einem Deckgläschen eingedeckt. Die histologische Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch.

2.2.16 Evaluierung subkonjunktival transplantierter Biomaterialien

Die Evaluation der histologischen Schnitte der subkonjunktival transplantierten Biomaterialien wird in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchgeführt. Die semiquantitative Auswertung erfolgt geblindet durch den leitenden Oberarzt Dr. med. Bernd Sellhaus.

Die Nachbeobachtungszeiträume werden in drei Gruppen eingeteilt:

- Kurzzeitverlauf (5 Tage bis 1 Woche)
- mittlere Nachbeobachtungszeit (2 bis 5 Wochen)
- Lanzeitverlauf (6 Wochen bis zur Degradation)

Für die Auswertung stehen im Kurzzeitverlauf von Amnion und PLLA jeweils sechs Implantate, von Seide fünf und von Kollagen drei Implantate zur Verfügung. Der mittlere Verlauf stützt sich auf 7-8 Implantate für jedes Biomaterial. In der Langzeitbeobachtung bis zur Degradation werden fünf Kollagen-, drei Amnion-, vier Seiden- und sechs PLLA Implantate evaluiert. Von drei Tieren pro Nachbeobachtungszeitraum und zwei Transplantationsarealen pro Tier werden die Schnitte mikroskopiert. Pro Schnitt werden vier hochauflösende Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung beurteilt: die beiden Endregionen und zwei Bereiche aus der zentralen Region des implantierten Materials. Bei Implantaten, die in der Endregion aufgefaltet sind, wird nur das Ende, nicht aber die Faltung bewertet. Im Falle eines deutlichen Abbaus des Materials oder kleinen Implantaten werden nur zwei Gesichtsfelder ausgewertet. Folgende Kriterien werden in die Evaluierung der histologischen Schnitte einbezogen:

- Gesamtzellzahl eines Gesichtfeldes: gezählt werden in direkter Umgebung um das Implantat ausschließlich Entzündungszellen bzw. neu eingewanderte Zellen. Die Mittelwerte aus diesen Zahlen werden aus den vier Gesichtsfeldern und allen Schnitten eines Nachbeobachtungszeitraumes (Kurzzeit, mittlere Zeit und Langzeit) gebildet.
- Entzündungszellen: Das Vorkommen von Zellen einer akuten Entzündung (eosinophile und neutrophile Granulozyten), einer chronischen Entzündung (Lymphozyten und Plasmazellen) sowie einer Fremdkörperreaktion (Makrophagen und Riesenzellen vom Fremdkörpertyp) wird bestimmt.

- Degradation des Materials: Die minimale und maximale Dicke des Materials wird ermittelt, um abbaubedingte Materialveränderungen nachvollziehen zu können. Im Falle einer unphysiologischen Veränderung wird diese Stelle des Materials nicht zur Dickenmessung herangezogen. Ist das Material weitestgehend degradiert, so wird die Größe des noch vorhandenen Implantationsareals gemessen.

- Ersatzgewebebildung: Eine Einkapselung des Implantats wird graduell beurteilt mit (+) für eine leichte Kapsel auf nur einer Seite des Materials, (++) bei fortgeschrittener Kapselbildung auf beiden Seiten und (+++) für eine ausgeprägte Kapsel um das Implantat. Außerdem wird das Vorhandensein von Granulationsgewebe notiert.

- Gewebestruktur: Das Auftreten von Neovaskularisation (neugebildete Gefäße), Hämorrhagie (Erythrozyten-Extravasat) oder Nekrose (Gewebs- und Zellkernabblassung) wird im Transplantationsareal beurteilt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Materialeigenschaften

Eine wichtige Voraussetzung für die Nutzung der Materialien in der Zellkultur und zur subretinalen Transplantation war eine gute Manipulierbarkeit. Die Folien mussten flexibel und gleichzeitig autostabil sein. Alle Materialien wurden als freitragende Folie bzw. als freitragendes Vlies produziert (Abbildung 3.1). Dies erlaubte eine Handhabung mit Pinzetten (A-D) im trockenen und feuchten Zustand. Das PLLA Vlies konnte am Rand (D, unten), der beim Elektrospinnen auf dem Aluminiumring zu liegen kam, von diesem gelöst und gehalten werden. Die Folien aus Kollagen, Amnion und Seide ließen sich gut mit Scheren oder einem Skalpell zuschneiden und erlaubten in der Zellkultur eine leichte Handhabung. Um die Autostabilität zu testen, wurden die verschiedenen Materialien mit einer Pinzette in Wasser getaucht. Zur besseren Visualisierung wurden die Folienstücke mit DTAF angefärbt (siehe Kapitel 2.2.1.1). Sobald die Materialien aus der Flüssigkeit gezogen wurden, falteten sie sich zusammen. Wurden sie anschließend wieder vollständig in Wasser eingetaucht, sorgte ihre Eigenstabiliät für eine Entfaltung im Wasser (E-H). Kollagen, Seide und Amnion entfalteten sich sofort und sanken annähernd plan ab. PLLA bildete die Ausnahme, da es sich nicht mit DTAF färben ließ, sich in Kontakt mit Wasser weder zusammen- noch entfaltete und an der Oberfläche schwebte (H).

Die Transplantation einer Folie als Zellträger und Ersatz für die Bruch'sche Membran setzt voraus, dass das Material ultradünn sein muss. Dies war bei allen der untersuchten Materialien der Fall. Zur Demonstration wurden die Folien und das Vlies in *cell crowns* eingespannt und mit einem darunter liegenden Text fotographiert (I-L). Es zeigte sich, dass aufgrund der minimalen Dicke und der transparenten Struktur aller Materialien schon in trockenem Zustand die Schrift gut zu lesen war (linke Bildhälfte). Die Seiden- und Kollagenmembran war ungetrübt transparent, bei der Amnionmembran und den PLLA Fasern kam die milchige, semitransparente Eigenschaft zutage. In nassem Zustand (rechte Bildhälfte) zeigten sich alle Materialien außer PLLA vollständig transparent und die Schrift war deutlich lesbar.

3.1.1 Oberflächenstrukturen der Biomaterialien

Da die Biomaterialien als Substrat für Zelladhäsion und Wachstum Einsatz fanden, war eine strukturelle Ähnlichkeit der Oberflächen mit der natürlichen extrazellulären Matrix (EZM) von Vorteil. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Materialoberflächen im trockenen Zustand machte vor allem Unterschiede zwischen Kollagen und Amnion im Vergleich zu Seide und Poly-L-Lactid deutlich. In der 1000-fachen Vergrößerung (Abbildung 3.2, A-D) demonstrierten Kollagen und Amnion ähnliche, leicht strukturierte Oberflächen. Seide dagegen wirkte glatter.

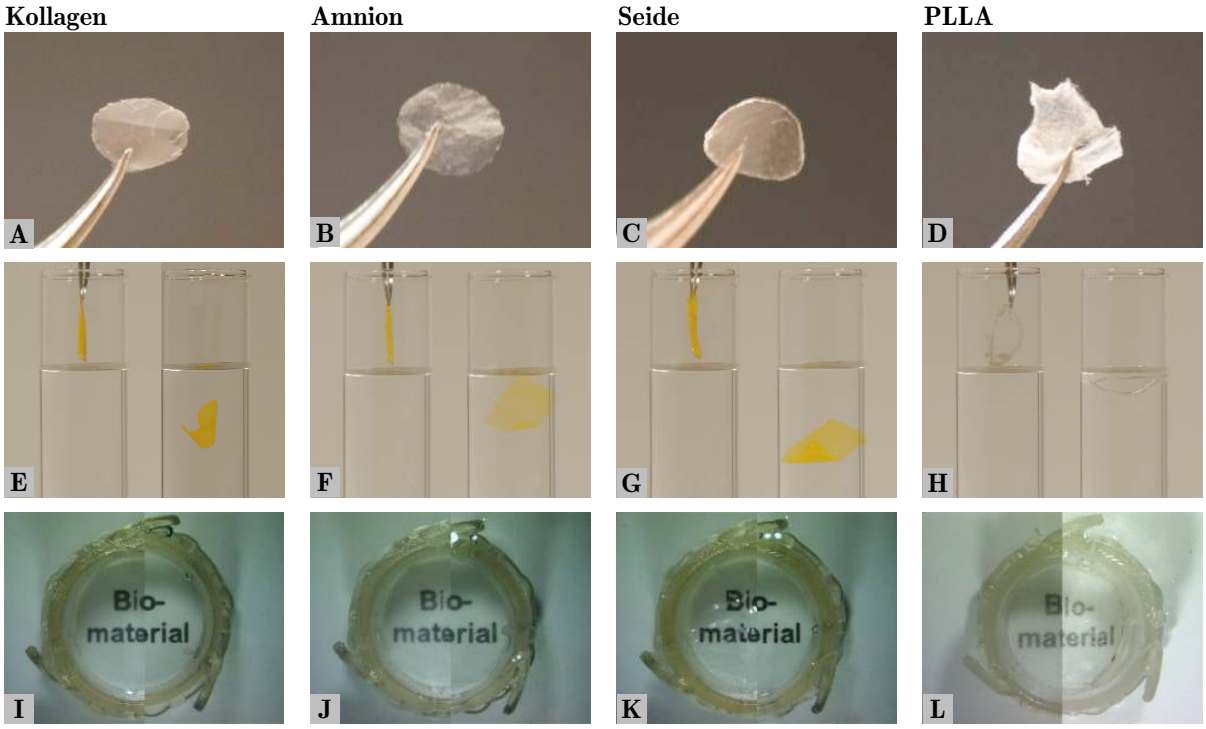


Abbildung 3.1: Materialeigenschaften: Die Membranen und das Vlies sind freitragend und ließen sich daher mit Pinzetten handhaben (A-D). Trotz ihrer geringen Dicke zeigten alle Membranen eine gute Autostabilität, da sie sich in Wasser sofort entfalteten (E-H). Zur besseren Visualisierung konnten die Materialien außer PLLA mit dem Farbstoff DTAF angefärbt werden. I-L verdeutlicht die Dünne der Materialien. Ein Text unterhalb des Materials konnte im trockenen Zustand (linke Bildhälften) und um so deutlicher im nassen Zustand (rechte Bildhälften) gelesen werden.

Das Faservlies bildete ein Netzwerk aus unorientierten, planar angeordneten Fasern, von denen einzelne tropfen- bis spindelartig verdickt waren.

Bei näherer Ansicht in 5000-facher Vergrößerung (E-H) wiesen auch Kollagen und Amnion verschiedene Strukturen auf. Im Kollagen ließen sich einzelne Fibrillen ausmachen, welche aufgrund ihrer Polymerstruktur, in der Kollagenmoleküle versetzt angeordnet sind, eine typische Querstreifung ergaben. Darüber hinaus war die Fläche durch Erhebungen und Furchen gekennzeichnet, wie es für eine EZM, bestehend aus unterschiedlichen Proteinen und Polysacchariden, charakteristisch ist. Die Oberfläche der Amnionmembran war nach Entfernung der Epithelzellschicht feiner, aber gestaltlos und wirkte amorph. Die Aufsicht auf die Basallamina der Epithelzellen ließ keine Fibrillen erkennen. Die Seidenmembran stellte sich auch in der höheren Vergrößerung als völlig glatt und plan heraus und zeigte somit keine Ähnlichkeit zu einer natürlichen EZM. Das Faservlies aus PLLA wies Teilaspekte einer EZM auf. Die strukturierten aber porenfreien Fasern besaßen unterschiedlich große Durchmesser und imitierten so Fibrillen und elastischen Fasern, die Bestandteil der EZM sind. Jedoch fehlten im Vlies Komponenten, die den Raum zwischen den Fasern ausfüllten und natürlicherweise in Form von hydrierten Gelen aus Glykosaminoglykanen vorkommen.

Um die Dicke der Membranen und des Vlieses einzuschätzen, wurde auch eine Schnittkante fotographiert (I-L). Hier wurde deutlich, dass die Amnionmembran mit etwa 5 µm das dünnste Trägermaterial war. Kollagen und Seide bewegten sich in einem Bereich von 10-15 µm, wogegen das PLLA Vlies eine Dicke von 10-20 µm aufwies. Diese Angaben waren zur Bestimmung einer

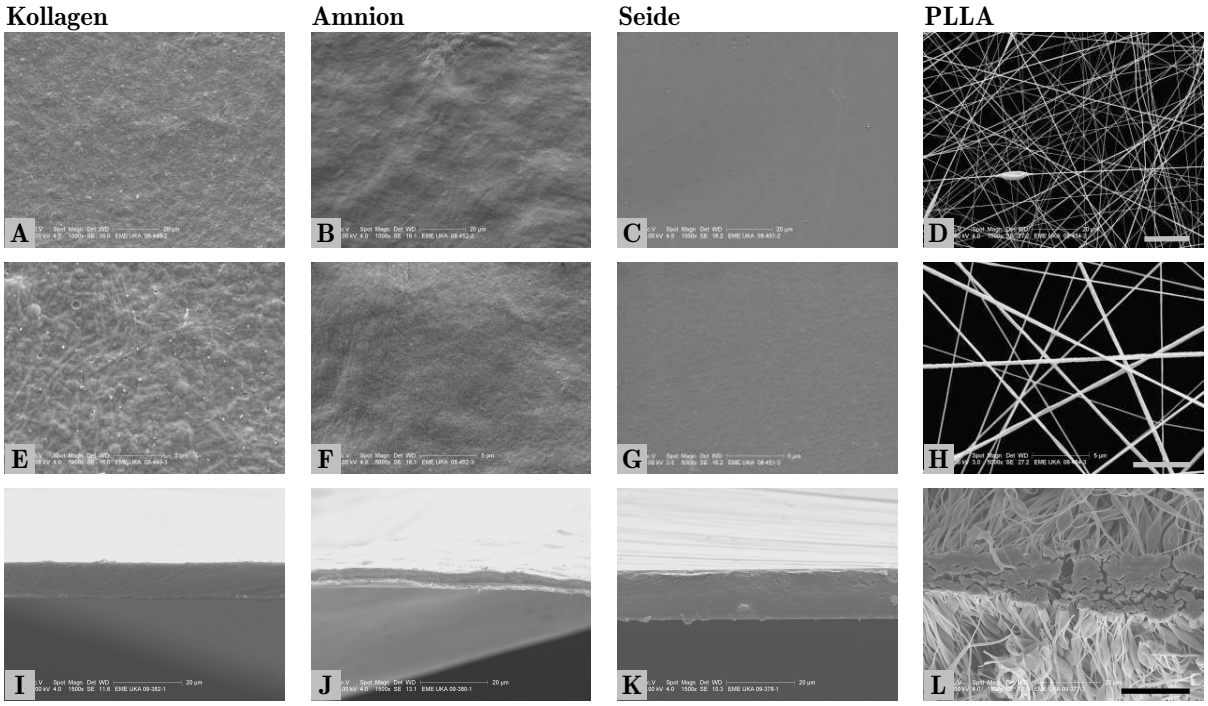


Abbildung 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der trockenen Materialoberflächen in 1000-facher (A-D) und 5000-facher Vergößerung (E-H) sowie die Aufsicht einer Schnittkante (I-L). Maßstäbe in D und L $\widehat{=}$ 20 µm, H $\widehat{=}$ 5 µm.

Größenordnung geeignet, nicht aber für die Festellung absoluter Werte. Die Problematik lag zum einen darin, die Schnittkante genau im rechten Winkel anzusetzen. Des Weiteren bestand vor allem bei den Nanofasern die Gefahr, das Material durch den Schnitt zu stauchen.

3.1.2 Benetzbarkeit der Materialoberflächen

Oberflächeneingenschaften von Materialien haben einen großen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit von Zellen. Eine hydrophile Fläche begünstigt die Zelladhäsion und Proliferation gegenüber einem hydrophoben Material. In diesem Test wurden Wassertropfen mit einem Volumen von 5 µl auf die Materialien gesetzt und das Verhalten bzw. die Größe des Tropfens wurde beobachtet (Abbildung 3.3). Ähnlich einer Kontaktwinkelmessung kann man davon ausgehen, dass ein hydrophiles Material zu einer flachen Tropfenform und damit einer großen Auflagefläche führt. Ein Tropfen auf einer hydrophoben Fläche kugelt sich ab und besitzt folglich weniger Kontakt zum Untergrund. In der Aufsicht stellt sich dies durch eine kleinere Gesamtfläche des Tropfens dar.

Während der Applikation des Wassertropfens ließ sich dieser auf Kollagen, Amnion und Seide leicht absetzen. PLLA Fasern waren jedoch deutlich hydrophober, so dass der Tropfen mit Hilfe einer Kanüle von der Pipettenspitze gelöst werden musste. Die Fläche der Tropfen auf Kollagen und Seide nahm innerhalb einer Minute bei allen Proben zu. Auf Amnion nahm bei drei der sechs Proben die Fläche leicht ab, auf PLLA verkleinerte sie sich bei allen Proben. Ausgehend vom Mittelwert beider Zeitpunkte war die Oberfläche von Amnion und Seide gleich gut benetzbar, was sich in den Tropfenflächen von $6,40\ \text{mm}^2$ und $6,38\ \text{mm}^2$ ausdrückte (Tabelle 3.1).

Die Kollagenmembran zeigte weniger hydrophile Eigenschaften, da die Tropfenfläche $4,88\ \text{mm}^2$ betrug. Im Vergleich der Materialien bestätigte sich für PLLA Fasern die geringste Benetzbarkeit und damit eine stark hydrophobe Oberfläche, denn die Fläche des Tropfens

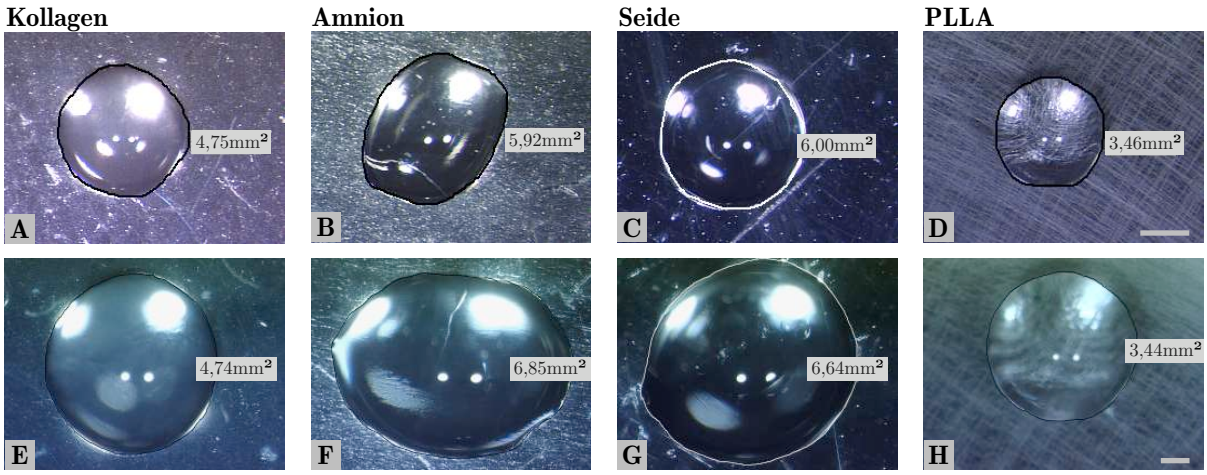


Abbildung 3.3: Benetzungseigenschaften der Biomaterialien. Ein Wassertropfen definierten Volumens wurde auf den Materialien appliziert und nach 20 s in zwei verschiedenen Vergrößerungen fotographiert. Mittels Diskus-*Software* wurde die Fläche der Tropfen ermittelt. Je größer die Fläche, desto hydrophiler ist die Oberfläche des Materials. Maßstab in D $\widehat{=}$ 1000 µm und H $\widehat{=}$ 400 µm.

Tabelle 3.1: Flächen der Wassertropfen im Median nach 20 bzw. 80 Sekunden und der aus diesen beiden Werten resultierende Mittelwert. Die ermittelten Flächen sind ausführlich in Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt.

	Fläche [mm²]		
Material	**nach 20 s**	**nach 80 s**	**Mittelwert**
Kollagen	4,75	5,02	4,88
Amnion	6,46	6,34	6,40
Seide	6,23	6,53	6,38
PLLA	3,46	3,35	3,40

von $3,40$ mm^2 war mit Abstand die kleinste.

3.1.3 Permeabilitätseigenschaft der Biomaterialien

Durch alle Biomaterialien und die nativen Gewebe aus Bruch'scher Membran und Choroidea (BM-CH) konnte eine Diffusion von Bromphenolblau Molekülen anhand des Farbausgleiches in beiden Kompartimenten der Kammer beobachtet werden. Außer PLLA ließen sich alle untersuchten Materialien problemlos in die Kammer einspannen. PLLA Fasern dagegen waren sehr fragil und mussten daher mit einer Lage Gaze auf beiden Seiten des Materials stabilisiert werden. Ein simultanes Einfüllen beider Lösungen verhinderte ein Durchmischen von Bromphenolblau und PBS zu Beginn der Messung.

Eine Voraussetzung für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten D war die Erstellung einer Eichreihe, um die gemessenen Extinktionswerte in Konzentrationen überführen zu können (vgl. Kapitel 2.2.4). Die Eichreihe mit BPB Lösungen bekannter Konzentrationen demonstrierte für beide Kompartimente einen linearen Anstieg der gemessenen Extinktionen und diente als Bezugspunkt für die Berechnung (Abbildung 3.4).

Des Weiteren musste für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten die Dicke der untersuch-

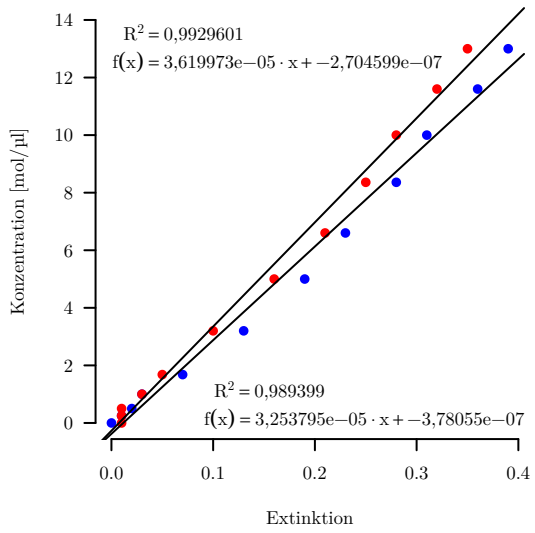


Abbildung 3.4: Eichreihe aus Extinktionen definierter Konzentrationen von BPB Lösungen (vgl. Tabelle A.3 im Anhang). Anhand dieser Regressionsgeraden für beide Kompartimente der Kammer wurden die gemessenen Extinktionen während der Diffusion durch die Biomaterialien in Konzentrationen transformiert.

ten Materialien bekannt sein. Für Kollagen ergab sich in der Dickenmessung (vgl. Kapitel 2.2.4.6) im Mittel ein Wert von 15 µm. Amnion zeigte im Vergleich von verschiedenen Spendermaterialien eine Dicke von 7 µm bis 14 µm. Zusätzlich ergaben sich aufgrund der manuellen Entfernung der Epithelzellschicht schwankende Werte innerhalb einer Membran abhängig von der gemessenen Position. Für die Permeationsversuche wurden ausschließlich Proben von 7 µm Dicke verwendet. Seide variierte je nach Fertigungsauflage zwischen 11 µm und 19 µm, im Mittel ergab sich hier ein Wert von 15 µm, der in zwei der drei Messungen angewendet wurde. Membranen einer weiteren Fertigungsauflage resultierten in niedrigeren Werten, so dass eine Permeationsmessung mit einer 10 µm dicken Membran durchgeführt wurde. Bei PLLA Fasern entstand während der Messung das Problem, dass die Fasern zum Teil an den Messarmen der Bügelschraube haften blieben und dadurch das Vlies verzogen. Daher schwankten die Werte stark zwischen 8 µm und 27 µm. Für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten wurde daher die Angabe des Herstellers von 15 µm eingesetzt. Die Dicke der bovinen Gewebe schwankte stark innerhalb einer Probe und zwischen den verschiedenen Geweben. Verwendet wurden Proben mit einer mittleren Dicke von 92 µm und 100 µm. Humane Membranen verschiedener Spender ergaben im Mittel einen Wert von 35 µm.

Der Diffusionskoeffizient ist ein Maß für die Beweglichkeit von Molekülen durch die Biomaterialien und Gewebe. Er lässt sich aus der diffundierten Teilchenmenge durch eine Fläche in einer bestimmten Zeit ermitteln und wird daher in cm^2/s angegeben (vgl. Kapitel 2.2.4.3). Um einen Nährstofftransport durch das Biomaterial zu gewährleisten, sollte der Diffusionskoeffizient in einem möglichst hohen Wert resultieren.

Die natürlichen Gewebe bestehend aus Bruch'scher Membran und Choroidea boviner bzw. humaner Herkunft ergaben die höchsten Diffusionskoeffizienten und erlaubten damit am meisten Diffusion der BPB- und PBS Lösung (Abbildung 3.5 und Tabelle 3.2). Obwohl die Standardabweichung des Diffusionskoeffizienten für das bovine Gewebe sehr hoch war, lag der Koeffizient nach Abzug der Standardabweichung dennoch über dem aller anderen untersuchten Membranen. Die deutliche Abweichung der Diffusionsmessungen im Gegensatz zur humanen BM-CH ließ sich auf die starken Schwankungen der Dickenmessung zurückführen (vgl. Tabelle A.4).

Eine Prüfung der Mittelwertunterschiede mittels t-Test für den Zweistichproben-Fall (Welch-

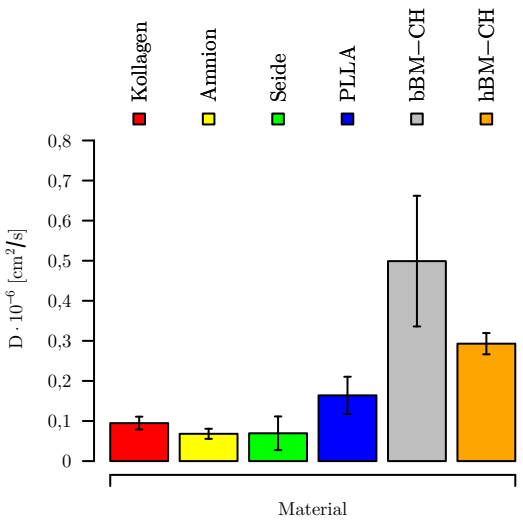


Abbildung 3.5: Diffusionskoeffizienten der Biomaterialien im Vergleich zu dem nativen Gewebeverband aus boviner bzw. humaner Bruch'schen Membran und Choroidea (BM-CH).

Test) ergab für die Diffusionskoeffizienten der bovinen BM-CH gegenüber Kollagen, Amnion und Seide p-Werte $< 0,05$ und damit eine statistische Signifikanz; der Unterschied zu PLLA war dagegen nicht signifikant. Der Diffusionskoeffizient der humanen BM-CH lag deutlich unter dem des bovinen Gewebes, ermöglichte jedoch eine bessere Diffusion als die vier Biomaterialien. Zwischen dem humanen Gewebe und allen Biomaterialien inklusive des PLLA Vlieses wurde eine statistische Signifikanz durch p-Werte $< 0,05$ bestätigt.

Unter den Biomaterialien wies das PLLA Faservlies die besten Diffusionseigenschaften auf. Der Diffusionskoeffizient lag in der gleichen Größenordnung von 10^{-7} wie die der humanen und bovinen Gewebe. Die verbleibenden Materialien Kollagen, Amnion und Seide unterschieden sich in ihrer Diffusion für BPB innerhalb der Größenordnung von 10^{-8}. Da der Koeffizient D von Kollagen annähernd an der Potenz 10^{-7} lag, ließ dieses Biomaterial mehr Diffusion zu als Seide und Amnion. Diese beiden Materialien wiesen die niedrigesten Diffusionskoeffizienten auf.

Die Tabelle 3.2 zeigt neben den Koeffizienten die Zeiträume, die bis zu einem Konzentrations- und damit Farbausgleich beider Kammern von 50% bzw. 95% ($t = T_{50\%}$ und $t = T_{95\%}$) durch die getesteten Membranen benötigt wurden. Da das Verhältnis von Diffusionskoeffizient zur Dicke des Materials ($\frac{D}{d}$) in den exponentiellen Term des Fick'schen Gesetzes eingeht, beeinflusst

Tabelle 3.2: Diffusionskoeffizienten der vier Biomaterialien und nativen bovinen und humanen BM-CH sowie die Zeitpunkte, an denen 50% bzw. 95% Konzentrationsausgleich vorlag. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Diffusionsläufen je Material, die Originalwerte der einzelnen Läufe sind in Tabelle A.2 im Anhang erfasst.

Material	**Dicke [µm]**	**D [cm²/s]**	**$T_{50\%}$ [h]**	**$T_{95\%}$ [h]**
Kollagen	15	$9,47\times10^{-8} \pm 1,61\times10^{-8}$	7,79 ± 1,41	33,65 ± 6,08
Anmion	7	$6,81\times10^{-8} \pm 1,26\times10^{-8}$	4,44 ± 0,36	22,39 ± 3,99
Seide	13	$6,94\times10^{-8} \pm 4,20\times10^{-8}$	10,85 ± 5,15	46,87 ± 22,27
PLLA	15	$1,64\times10^{-7} \pm 4,65\times10^{-8}$	4,62 ± 1,24	19,97 ± 5,34
b BM-CH	96	$4,99\times10^{-7} \pm 1,63\times10^{-7}$	9,84 ± 2,85	43,26 ± 17,33
h BM-CH	35	$2,93\times10^{-7} \pm 2,65\times10^{-8}$	5,78 ± 0,50	24,97 ± 2,16

dieses den zeitlichen Verlauf des Konzentrationsausgleiches exponentiell. Je größer das Verhältnis ($\frac{D}{d}$) ist, desto kürzer ist der Zeitraum bis zu einem Ausgleich der Lösungen. Bei kleineren Verhältnissen kehrt sich diese Eigenschaft um und die Zeit bis zu einem Ausgleich verlängert sich.

Dies erklärt, dass Amnion aufgrund der geringsten Materialdicke trotz niedrigem Diffusionskoeffizienten die kürzeste Zeit bis zu einem 50%igen Konzentrationsausgleich benötigte. Da PLLA, obwohl es doppelt so dick ist, einen größeren Diffusionskoeffizienten als Amnion besaß, ergab sich für das Vlies bis zum 95%igen Ausgleich ein kürzerer zeitlicher Verlauf als bei Amnion. Die vielfache Dicke der bovinen BM-CH im Vergleich zu allen anderen Materialien hatte einen deutlichen Effekt auf die T95% Zeit und verlängerte diese trotz des höchsten Diffusionskoeffizienten stark.

Für Seidenmembranen wurde der niedrige Diffusionskoeffizient nicht durch die Materialdicke ausgeglichen, was zu den längsten Zeitverläufen bis zu einem Ausgleich von 50% und 95% führte. Zudem schien während einer der drei Permeationsmessungen ein Teil der Bromphenolblau Moleküle von der Seide aufgenommen zu werden, denn das Kompartiment mit BPB Lösung wurde über die Zeit zunehmend heller, das PBS färbte sich jedoch wenig blau und es kam zu keinem vollständigen Farbausgleich. Dies erklärt auch die hohe Standardabweichung bei diesem Material.

3.1.4 Heterogene Eigenschaften zwischen Fertigungsauflagen der Biomaterialien

Im Laufe der *in vitro* und *in vivo* Experimente wurden von allen Biomaterialien verschiedene Fertigungsauflagen verwendet. Die Amnionmembranen unterschiedlicher Spenderinnen zeigten durchweg ein gleiches Verhalten bezogen auf die physikalischen Eigenschaften, die Handhabung und das Zellwachstum. Im Verlauf einer Inkubation des Materials in Medium über 2,5 Monate bei 37 °C wurden keine Verschlechterungen in der Handhabung oder quellende Eigenschaften beobachtet.

Verschiedenartige Erschwernisse im Umgang mit den anderen Materialien traten jedoch auf. Eine Fertigungsauflage der Kollagenmembranen trübte sich innerhalb von Minuten nach Kontakt mit Wasser oder Medium (Abbildung 3.6, B). Zudem quoll das Material in Medium mit und ohne Zellbesiedelung innerhalb von einer Woche Inkubation im Brutschrank. Die Folien hafteten am Boden der Kulturschalen und mussten zum Ablösen mit Pinzetten manipuliert werden. Wurde die Folie aus dem Medium herausgenommen, bildete sie einen unförmigen gallertartigen Tropfen an der Pinzette (A). Eine Entfaltung zurück im Medium war nicht mehr möglich. Daher wurden diese Folien nicht für Experimente benutzt. Neue Fertigungsauflagen wurden vor Verwendung für mehrere Wochen in Medium inkubiert und im Abstand von wenigen Tagen bis zu zwei Wochen auf Quellen, Handhabung und Trübung getestet. Es ergab sich, dass diese neuen Membranen auch milchig trüb wurden und nach zwei Wochen leicht gequollen waren. Trotzdem hafteten sie nicht am Boden der Kulturschale und konnten bis zum Ende der Beobachtung nach insgesamt 5,5 Monaten stets gut mit Pinzetten gehandhabt werden. Eine sofortige Entfaltung in Medium zeigte sich ebenfalls zu jedem Zeitpunkt. Aus diesem Grund wurden diese Kollagenmembranen wieder für Studien eingesetzt.

Seidenmembranen wiesen abhängig von der Fertigungsauflage im trockenen Zustand Unterschiede in ihrer Struktur auf. Generell erschienen die trockenen Membranen brüchig und ähnlich zu knittrigem Papier. Andere Fertigungsauflagen waren deutlich glatter und flexibler. Als einziges Material zeigte Seide in der Fluoreszenzmikroskopie eine ausgeprägte Autofluoreszenz (C), welche die Mikroskopie zum Teil erschwerte (vgl.Kapitel 3.2.2). In der Zellkultur traten Unterschiede in der Dichte der Zellbesiedelung auf, die ebenfalls auf verschiedene Materialauflagen zurückzuführen waren (vgl. Kapitel 3.2.1, Kapitel 3.3.3 und Kapitel 3.6.1).

Eine Quellung oder verminderte Manipulierbarkeit von Seidenmembranen wurde über eine

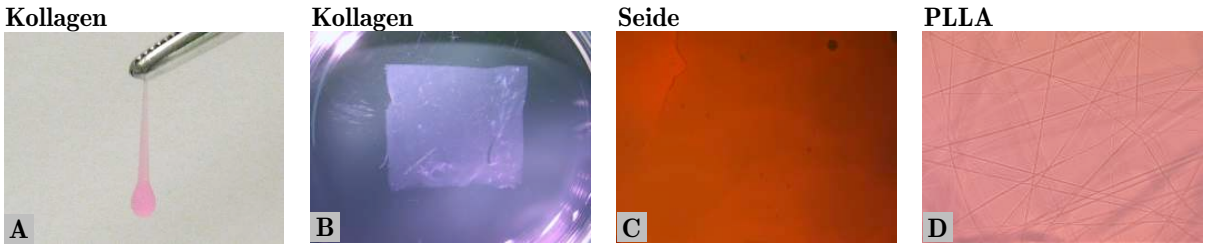


Abbildung 3.6: Probleme mit verschiedenen Fertigungsauflagen von Kollagen führten dazu, dass die Folien quollen (A) und eine starke Trübung entwickelten (B). Seide zeigte in der Fluoreszenzmikroskopie im nativen Zustand eine starke Autofluoreszenz (C). PLLA Vliese lockerten nach mehreren Wochen in Medium deutlich auf, da viele einzelne Fasern im Netzwerk rissen.

Beobachtungszeit von 3,5 Monaten nicht festgestellt.

Die Faservliese aus Poly-L-Lactid zeigten in einer Testphase von 2,5 Monaten in Medium und Inkubation im Brutschrank keinerlei quellende Eigenschaften. Allerdings wurde deutlich, dass sich das Fasernetzwerk mit der Zeit auflockerte, da einzelne Fasern im Vlies rissen (D). Generell trat bei einer Aussaat von Zellen auf dem Material das Problem auf, dass viele Zellen initial durch das Maschenwerk hindurchfielen. Für Kulturen von Primärzellen zur Vitalfärbung bzw. RNA Isolierung wurden unterschiedliche Fertigungsauflagen von PLLA Vliesen verwendet. Dies schien Einfluss auf die Zelldichte zu nehmen, denn die Vliese für Vitalfärbungen waren insgesamt dichter mit Zellen besiedelt (vgl. Abbildung 3.18, Abbildung 3.19 und Abbildung 3.24 bzw. Abbildung 3.25).

3.2 Vitalfarbstoff PKH26

3.2.1 Darstellung von ARPE-19 Zellen durch die PKH26 Färbung

Mittels Durchlichtmikroskopie war es aufgrund der Folien als Wachstumsuntergrund nur bedingt möglich, die unpigmentierten ARPE-19 Zellen zu erkennen. Ohne eine Zellfärbung ließ sich deren Morphologie und Dichte des Zellrasens kaum beurteilen. Deshalb wurden die Zellmembranen zur besseren Darstellung mit dem Vitalfarbstoff PKH26 angefärbt. Die Färbung ist keine Sättigungsreaktion sondern eine Funktion aus Farbstoffkonzentration und Zellzahl. Für ARPE-19 Zellen stellte sich ein Verhältnis von 1 µg in 1 ml Diluent C und 500.000 Zellen optimal für die Färbung bei unbeeinträchtigter Lebensfähigkeit der Zellen heraus. Generell wurde der Farbstoff von den Zellen sehr gut vertragen und während der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs verminderte sich daher im Kulturverlauf.

Die Zellen besiedelten Areale oder die ganze Fläche der Materialien dicht und waren durch den roten Membranfarbstoff gut zu erkennen (Abbildung 3.7, A-H). Die Lokalisation des Zellkerns konnte teils als ungefärbte Ellipse im roten Zellkörper ausgemacht werden und deckte sich mit der blauen Hoechst 33342 Färbung der Zellkerne (I-L). Anhand der Kernfärbung wurde deutlich, dass 100% der Zellen mit PKH26 markiert worden waren. Auf allen Substraten wurde nach zwei Kulturtagen eine homogene Morphologie der Zellen beobachtet (A-D). Die Zelldichte auf dieser Fertigungsauflage der Seide war am höchsten mit einem konfluenten Zellrasen über der gesamten Folie. Auf Kollagen wurde innerhalb von zwei Tagen eine Subkonfluenz erreicht, auf Amnion waren große Areale mit einer dichten Monoschicht bedeckt. Die deutlich geringste Zelldichte zeigte sich auf PLLA beschichteten Deckgläschen. In diesem Fall wurden die Zellen nicht auf den freitragenden PLLA Vliesen ausgesät, weil zunächst die prinzipielle Verträglichkeit von Polylactid als Substrat gezeigt werden sollte. Nach vier Tagen wurde deutlich, dass sich

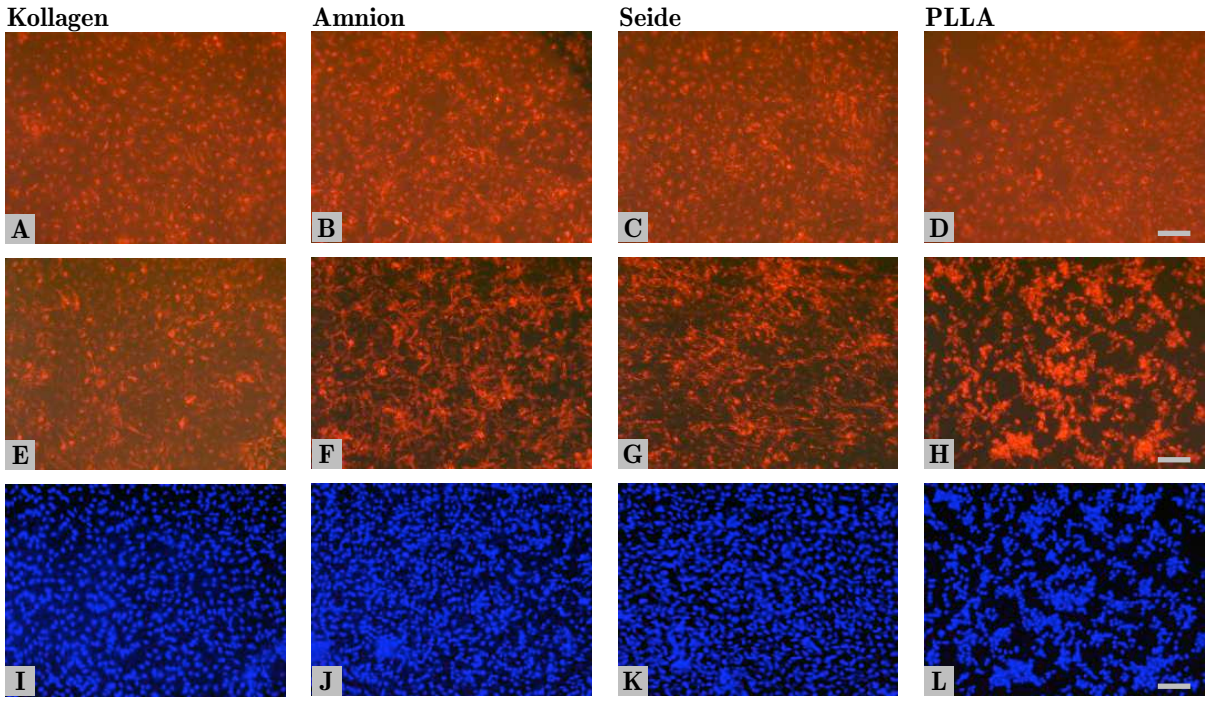


Abbildung 3.7: Färbung von ARPE-19 Zellen mit dem Membranfarbstoff PKH26 nach zwei (A-D) und nach vier Tagen Kultivierung (E-H). Korrespondierend zu E-H stellt I-L die Kernfärbung mit Hoechst 33342 dar. Maßstäbe in D, H und L $\widehat{=}$ 100 µm.

die ARPE-19 Zellen auf Amnion nicht gleichmäßig über die Fläche anordneten, sondern sich regelmäßig wiederkehrend gruppierten (F). Zellen auf Kollagen entwickelten sich in dieser Zeit zu einer konfluenten Monoschicht und hielten ihre homogene Erscheinung aufrecht (E). Auf Seide zeigten sich bereits Anzeichen einer Hyperkonfluenz (G), wobei die PKH26 Färbung der Zellen unterschiedlich intensiv war. Lediglich auf PLLA waren wie nach zwei Kulturtagen nur Areale konfluent bewachsen, der größte Anteil wies Unterbrechungen im Zellverband auf (H, L). Im Vergleich zu den anderen Materialien zeigte sich die Morphologie der Zellen gedrungen, weshalb die Fluoreszenz des PKH26 Farbstoffs intensiver leuchtete (H).

3.2.2 PKH26 Färbung von Primärzellen zur Detektion

Bovine retinale Pigmentepithel- und Irispigmentepithel Zellen sind aufgrund ihrer Pigmentierung sowohl makroskopisch als auch in der Durchlichtmikroskopie gut zu erkennen. Generell ist es für eine Detektion der Zellen nach einer Transplantation jedoch wichtig, diese Zellen vorher markieren zu können. Nur so wird eine sichere Unterscheidung der transplantierten von den lokal ansässigen Zellen möglich. Deshalb wurden auch primäre bRPE und bIPE Zellen mit dem Vitalfarbstoff PKH26 angefärbt. Abbildung 3.8 zeigt in A-D eine Übereinanderlagerung der PKH26 Färbung mit der Durchlichtaufnahme, in E, F und H die Fluoreszenzaufnahme allein.

Bei Primärzellkulturen fand sich bedingt durch die Präparation immer freies Pigment zwischen den Zellen. Da dieses eine leichte Autofluoreszenz zeigte, war eine flächige Rotfärbung die Folge, in der die Zellen nicht mehr so kontrastreich zu unterscheiden waren wie die Zelllinie. Zusammen mit der Durchlichtaufnahme der Zellpigmentierung wurden die Zellformen klarer, und verdeutlichten, dass alle Zellen mit PKH26 gefärbt wurden (A-D). Nach 14 Tagen Kultivierung hatten sich auf Kollagen und Amnion konfluente Zellrasen über den größten Teil der Materialien

entwickelt. Wie schon ARPE-19 Zellen demonstrierten die Primärzellen auf Amnionmembran ein Wachstum in Zellgruppen und nicht so gleichmäßig wie Zellen auf Kollagen. Die Zelldichte auf Seide war mit konfluenten Arealen und lockeren Zellverbänden (C) geringer als auf den vorherigen Wachstumssubstraten.

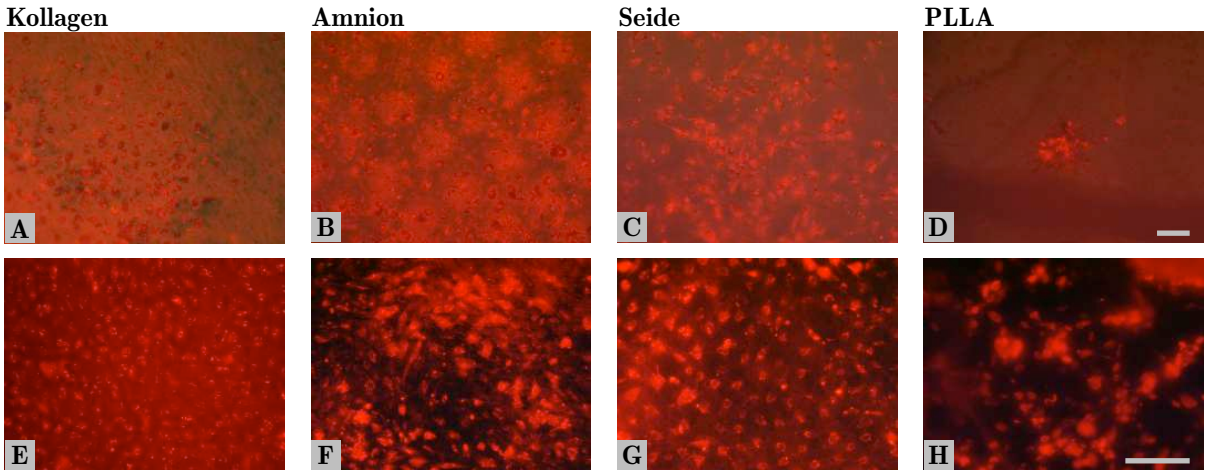


Abbildung 3.8: Färbung von bovinen RPE Zellen mit dem Membranfarbstoff PKH26. A-D zeigt eine Übereinanderlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme, E-H nur die PKH26 Markierung. Maßstäbe in D und H $\widehat{=}$ 100 µm.

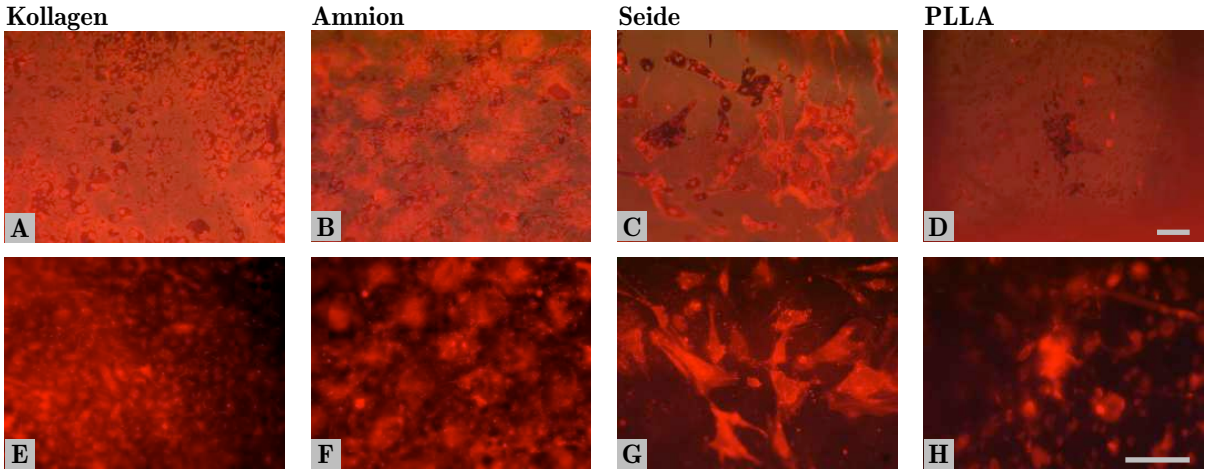


Abbildung 3.9: Färbung von bovinen IPE Zellen mit dem Membranfarbstoff PKH26. A-D zeigt eine Übereinanderlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme, E-H nur die PKH26 Markierung. Maßstäbe in D und H $\widehat{=}$ 100 µm.

Nur einzelne Zellaggregate konnten auf Faservliesen mikroskopiert werden (D). Neben der Zellfärbung wiesen auch die PLLA Fasern und vor allem ihre Verdickungen eine Autofluoreszenz auf, ebenso wie die Mullfasern, die unterhalb der Vliese lagen. Dies erschwerte die Mikroskopie und Lokalisierung der Zellen erheblich. Auf dem Boden des Kulturgefäßes unter den Vliesen fand sich ein konfluenter, gefärbter Zellrasen. Folglich konnte die Mehrzahl der Zellen nach der Aussaat auf dem Fasernetz nicht adhärieren.

Nach einer Kulturdauer von 21 Tagen wurden zusätzlich zu PKH26 die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt. Eine Kernfärbung der Primärzellen auf Seide war wahrscheinlich aufgrund der starken Autofluoreszenz des Materials nicht zu erkennen (vgl. Kapitel 3.1.4). Zudem erleichterte die Kernfärbung die Detektion von Zellen auf PLLA nur bedingt, denn die Autofluoreszenz der Gaze überstrahlte die Kerne. Zur besseren Darstellung der Kulturen wurde deshalb auf eine Abbildung der Zellkerne verzichtet.

Die Zelldichte auf Seide und PLLA hatte zugenommen, so dass sich nach drei Wochen auf Kollagen, Amnion und Seide in sehr ähnlicher Weise konfluente Monoschichten entwickelt hatten.

Aufgrund der dunkleren Pigmentierung von IPE Zellen setzte sich ihre PKH26 Färbung in der Übereinanderlagerung mit dem Durchlichtbild besser vom Hintergrund ab (Abbildung 3.9) als bei RPE Zellen. Trotz einer durchweg geringeren Zelldichte zeigte IPE ein ganz ähnliches morphologisches Bild auf Kollagen und Seide wie die RPE Zellen (A, E und B, F). Auch nach drei Wochen Kultur hatte sich auf keinem der Materialien eine vollständige Monoschicht gebildet, aber große Teile waren konfluent. Die Morphologie von IPE Zellen auf Seide war dedifferenziert und deutlich vergößert, da die Zellzahl zu gering war, um dichte Verbände zu entwickeln. Dies ermöglichte jedoch eine genaue Detektion der Zellen über die Rotfärbung und stellte auch nicht pigmentierte Bereiche des Zellplasmas dar (C und G).

3.2.3 Kryoschnitte PKH26 markierter Zellen

Nach einer subretinalen Transplantation von Biomaterialien, die mit einer konfluenten Zellschicht bewachsen sind (sog. Zell*sheets*), sollen zukünftig in der Aufarbeitung der Augen Dünnschnitte angefertigt werden. Deshalb war es von Bedeutung, ob der Membranfarbstoff im histologischen Schnitt noch fluoreszierte. Es stellte sich heraus, dass PKH26 nach der Aufbreitung zum Paraffinschnitt nicht mehr nachweisbar war. Im Kryoschnitt jedoch konservierte der Farbstoff seine Fluoreszenz, so dass die Zellen auch nach Fixierung und Schneiden noch rot leuchteten. Kryoschnitte wurden angefertigt, um ARPE-19 Zellen bzw. Primärzellen auf den Biomaterialien im Querschnitt darzustellen. Von PLLA Vliesen war die Herstellung von Gefrierschnitten nicht möglich, da das Vlies zu wenig Stabilität und keine flächige Form einer Folie aufwies. Zusammen mit einer unterstützenden Lage Gaze und einer Nitrozellulosemembran war es zwar möglich, das Material auszublocken und zu schneiden, jedoch zeigt sich im Schnitt ein Gewirke aus Gaze und Nanofasern, in dem Zellen nicht auszumachen waren.

3.2.3.1 Kryoschnitte von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien

Die Beschichtung aus PLLA Lösung, welche als Untergrund für ARPE-19 Zellen verwendet wurde (siehe Kapitel 3.2.1), ließ sich wie eine Folie von dem Glasplättchen ablösen und handhaben. Dieses PLLA Material konnte ohne Probleme im Kryostat geschnitten werden.

Auf allen Materialien waren rot gefärbte Zellen in engem Kontakt zum Basismaterial und zu benachbarten Zellen zu sehen (Abbildung 3.10).

Die Kernfärbung zeigte sich bei einzelnen Zellen abhängig von der Schnittebene. Die Form der Zellen auf Kollagen und Amnion entsprach den Erwartungen, denn in einem dichten Zellverband sind Zellen kubisch und leicht konvex geformt. Im Gegensatz dazu erschienen ARPE-19 auf Seide flacher und expandierter im Querschnitt. Auf der PLLA Beschichtung wuchsen Zellen zum Teil übereinander und bildeten eine häufig kugelige Morphologie aus.

3.2.3.2 Kryoschnitte von Primärzellen auf Materialien

Auf allen Materialien adhärierten sowohl bRPE als auch bIPE Zellen vollständig und bildeten einen engen Kontakt zu ihrem Wachstumssubstrat. Die RPE Zellen entwickelten auf Kollagen

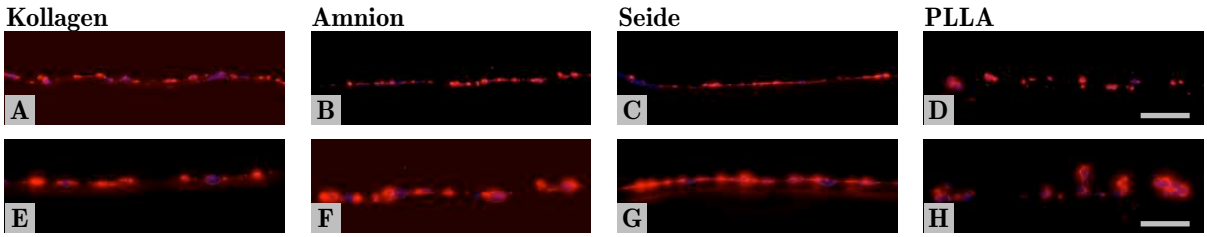


Abbildung 3.10: Kryoschnitte von ARPE-19 Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien. PLLA wurde hier in Form einer folienartigen Beschichtung verwendet. Zur besseren Darstellung wurden die Zellen mit PKH26 und die Zellkerne mit Hoechst 33342 gefärbt. Maßstäbe in D $\widehat{=}$ 100 µm und H $\widehat{=}$ 50 µm.

und Amnion einen einschichtigen konfluenten Verband, was durch den engen Kontakt zu benachbarten Zellen deutlich wurde (Abbildung 3.11). Zellen auf Seide lagerten sich in Ausnahme leicht übereinander (C). Zellen auf Seide und Kollagen waren stärker pigmentiert als auf Amnion. Die Morphologie der Zellen war auf den drei Materialien ähnlich, auf Amnion kamen in Ausnahme abgekugelte Zellen vor (H). Die Pigmentierung der Zellen und die Folie wurden durch Übereinanderlagerung der Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme sichtbar. Teilweise ist auf den Bildern die Nitrozellulosemembran zu sehen (F), die als Träger für das Zell*sheet* während des Transfers auf den Kryoblock diente. In den Querschnitten bestätigte sich Amnion als das dünnste Folienmaterial (vgl. Abbildung 3.2). Kollagen wirkt hier deutlich dicker als Seide, was auf die Schnittebene zurückzuführen war.

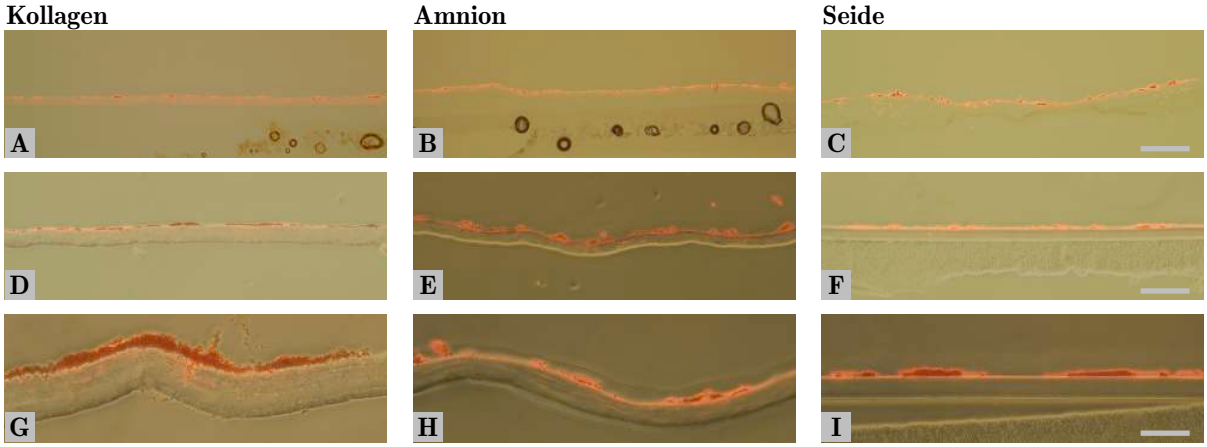


Abbildung 3.11: Kryoschnitte von PKH26 gefärbten bovinen RPE Zellen auf Kollagen, Amnion und Seide nach drei Wochen Kultivierung. Maßstäbe in C $\widehat{=}$ 200 µm, F $\widehat{=}$ 100 µm und I $\widehat{=}$ 50 µm.

Bei IPE Zellen ließen sich nur Zell*sheets* aus Kollagen und Amnion gut vergleichen, da es hier konfluente Areale gab, die im Querschnitt eng benachbarte Zellen zeigten (Abbildung 3.12). Auf Seide war jedoch, wie schon in der Aufsicht gezeigt, kein konfluenter Zellrasen zu sehen. Dadurch, dass die Zellen in lockeren Zellverbänden auf Seide adhärierten, fanden sich im Kryoschnitt größere Abstände zwischen Zellen und kein Folienabschnitt mit mehreren direkt benachbarten Zellen. Die Morphologie der einzelnen Zellen ähnelte in der Größe und Form jedoch den Zellen

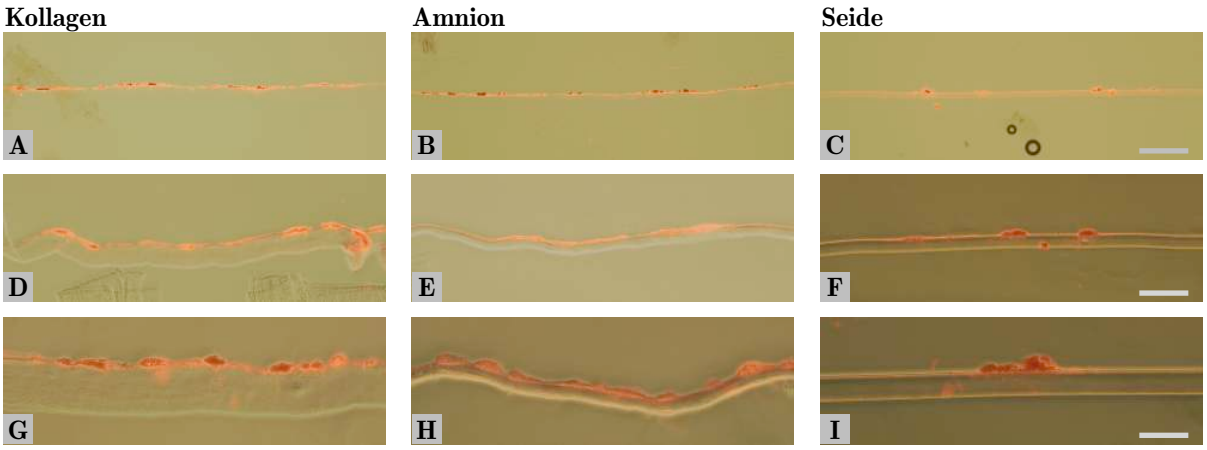


Abbildung 3.12: Kryoschnitte von PKH26 gefärbten bovinen IPE Zellen auf Kollagen, Amnion und Seide nach drei Wochen Kultivierung. Maßstäbe in C $\widehat{=}$ 200 µm, F $\widehat{=}$ 100 µm und I $\widehat{=}$ 50 µm.

auf Kollagen und Amnion. Wie bei RPE Zellen wies IPE auf Amnionmembran die geringste Pigmentierung auf.

3.3 Zellkultur von RPE und IPE Zellen auf Biomaterialien

Die Zelladhäsion, das Wachstum und die Vitaliät von ARPE-19 Zellen und primären bovinen RPE und IPE Zellen wurde während der Kultivierung auf den vier Biomaterialien und Glasplättchen als Kontrolle beobachtet. Da Primärzellen nach Präparation im Allgemeinen ein langsameres Wachstumsverhalten zeigen als Zelllinien, wurden ARPE-19 Zellen für diese Untersuchungen bis zu einer Woche kultiviert, die Primärzellen dagegen bis zu einem Monat. Zudem wurden die primären Zellen initial mit einer 5-fach höheren Zelldichte als ARPE-19 Zellen ausgesät, um eine Dedifferenzierung aufgrund einer zu niedrigen Zelldichte und damit übermäßig induzierter Proliferation zu vermeiden.

3.3.1 Zellwachstum des bovinen RPEs auf Biomaterialien

Vier Tage nach Präparation waren RPE Zellen auf der Glaskontrolle und Kollagenfolie bereits adhärent und ausgebreitet (Abbildung 3.13). Die Zellen zeigten alle Eigenschaften, die für eine differenzierte und RPE charakteristische Morphologie sprechen: eine gleichmäßige Pigmentierung, die nur den Bereich des Zellkerns ausspart, eine hexagonale Zellform und eine homogene Anordnung in der Monoschicht, die häufig als Kopfsteinpflaster Morphologie beschrieben wird (A, B).

Auch auf Amnion adhärierten RPE Zellen, jedoch in einer geringeren Zelldichte als auf Glas und Kollagen, so dass nicht die gesamte Fläche des Materials besiedelt war (C). Die Morphologie der Zellen war ebenfalls gut und zeigte keine Anzeichen von Dedifferenzierung, welche sich in einer Depigmentierung oder einer elongierten Zellformen im geschlossenen Verband darstellen würde.

Auf der Seidenmembran adhärierten zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger Zellen als auf den anderen Materialien, denn es konnten nur kleine Zellaggregate oder lockere Verbände beobachtet werden (D). Um Kontakt zu benachbarten Zellen zu erhalten, war die Zellmorphologie häufiger elongiert, die Pigmentierung zeigte sich jedoch ähnlich zu den Zellen auf Glas. Aufgrund der

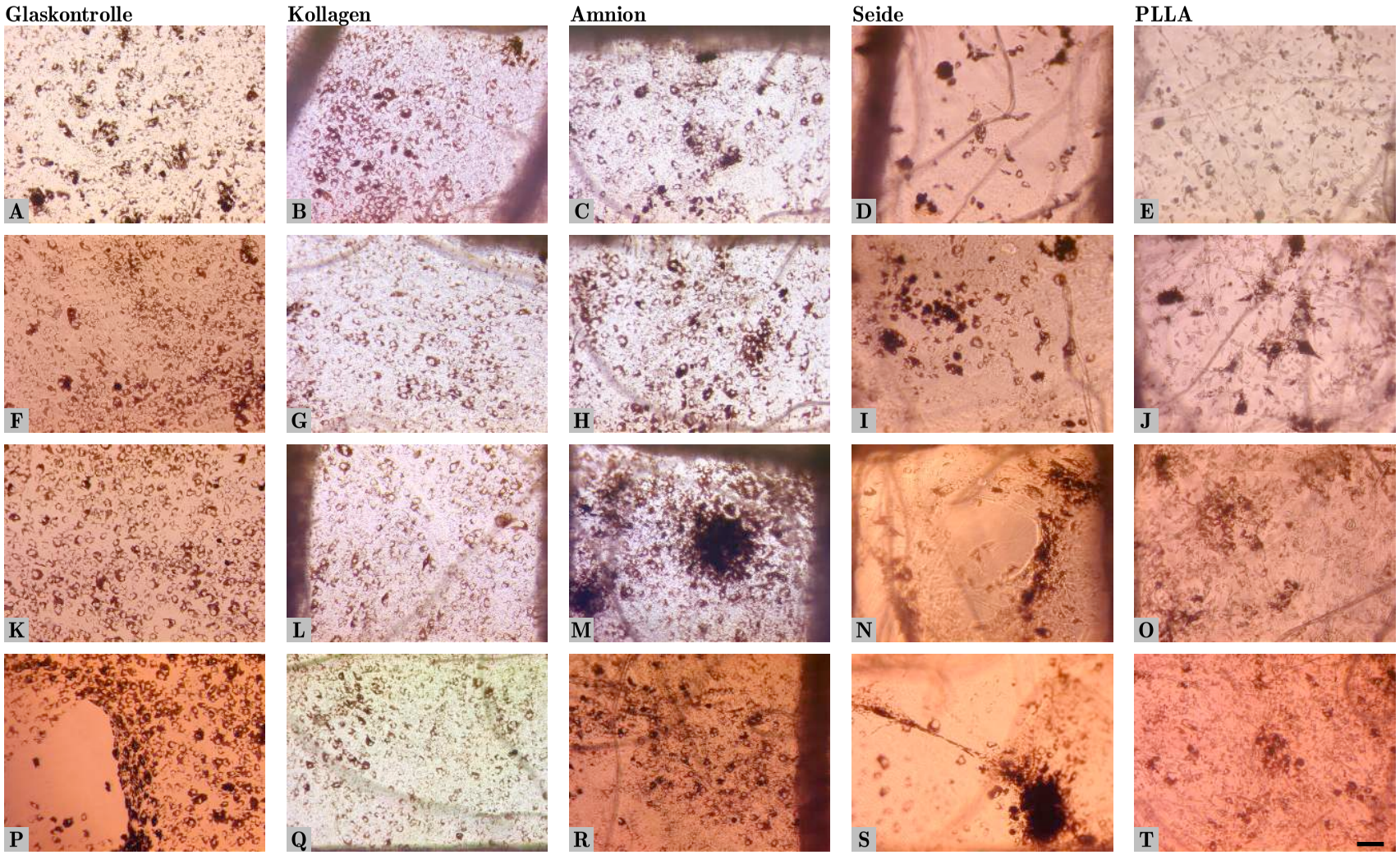


Abbildung 3.13: Morphologie der bovinen RPE Zellen im Kulturverlauf auf Biomaterialien und der Glaskontrolle; nach 4 Tagen (A-E), 7 Tagen (F-J), 11 Tagen (K-O) und 18 Tagen (P-T). Da während dieser Kultivierung die Biomaterialien in *cell crowns* mit einer Lage Gaze stabilisiert wurden, sind zum Teil Fasern der Gaze auf den Abbildungen zu sehen (z.B. B, H, R, J). Maßstab $\widehat{=}$ 100 µm.

maschenartigen Struktur des PLLA Vlieses adhärierte ein Großteil der Zellen nach der Aussaat nicht auf den Fasern, sondern breitete sich auf dem Boden der Kulturschale aus. Dementsprechend waren nur Teile des Vlieses besiedelt und die Zelldichte entsprach derer auf Seide; die Zellmorphologie erwies sich aber überwiegend als kugelig und noch nicht ausgebreitet (E).

Nach sieben Tagen Kultur zeigten die Zellen auf der Glaskontrolle und Kollagenfolie sehr ähnliche Charakteristiken, nämlich einen konfluenten Zellrasen mit starker Pigmentierung und homogener Morphologie (F, G). Die Amnionmembran war zu diesem Zeitpunkt nicht ganzflächig konfluent bewachsen, wies jedoch eine ähnliche Zellmorphologie wie auf den anderen beiden Substraten auf (H). Die Zelldichte auf den Seidenmembranen hatte deutlich zugenommen und Teile der Fläche waren dicht besiedelt (I). Innerhalb dieser dichten Zellrasen war die Morphologie hexagonal, in den lockeren Zellverbänden jedoch weiterhin elongiert und sehr unterschiedlich stark pigmentiert. Auf den PLLA Faservliesen waren die adhärenten Zellen ausgebreitet und meist in Zellaggregaten angeordnet (J). Es gab hier keine deutliche Zunahme der Zelldichte, so dass Seide sich zu diesem Zeitpunkt in der Dichte den Nanofasern angenähert hatte.

Nach elf Tagen Kultur begannen sich die konfluenten Zellrasen auf Glas an wenigen Stellen zusammenzuziehen. Ähnliches zeigte sich auf Seide, denn die Zellen kontrahierten ebenfalls und lösten sich zum Teil von dem Material ab, zudem zeigten viele Zellen eine Depigmentierung (N). Trotz einer Zunahme der Zelldichte im Vergleich zu der ersten Woche, hatten RPE Zellen auf Seide zu diesem Zeitpunkt keine konfluente Monoschicht entwickelt. Auf den Nanofasern nahm die Zelldichte leicht zu und es konnten viele kleine Zellaggregate und dicht besiedelte Bereiche der Vliese dokumentiert werden (O), es entstand jedoch keine vollständige Konfluenz wie auf Glas (K). Das mikroskopische Bild der Zellen auf Kollagen und Amnion hatte sich von Tag 7 bis 11 nicht geändert.

Nach 18 Tagen Kultur zeigte sich ein vermehrtes Ablösen der konfluenten Zellen sowohl auf Glas als auch auf Seide (P, S), die Morphologie der übrigen Zellen verblieb epithelial. Auf den Nanofasern erhöhte sich die Zelldichte im Vergleich zu elf Tagen leicht (T).

Auf der Amnionmembran zeigte sich ein ähnliches Bild zu Glas und Seide, da auch hier Bereiche des Zellrasens kontrahierten. Zudem konnten stark lichtbrechende, abgelöste Einzelzellen über der Monoschicht beobachtet werden (R). Die Zellen auf der Kollagenfolie veränderten sich nicht und stellten fortwährend eine homogene Monoschicht dar (Q).

Insgesamt zeichneten sich Kollagen und Amnion als sehr gute Substrate für das Wachstum primärer Zellen *in vitro* aus. Bei den anderen beiden Biomaterialien traten Probleme während der Kultivierung auf, wie die niedrige Rate an initialer Zelladhärenz auf den PLLA Nanofasern bzw. die frühe Kontraktion von Zellen auf Seide. Dennoch konnten auf allen Biomaterialien konfluente Areale mit einer für RPE Zellen charakteristischen Morphologie kultiviert werden, die potentiell für eine Transplantation geeignet sind (Abbildung 3.14).

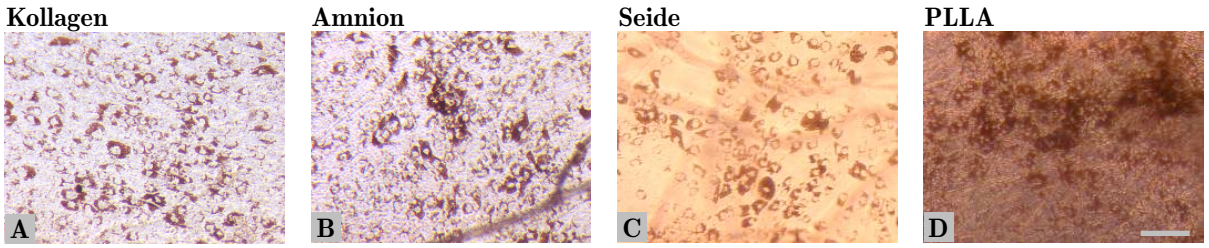


Abbildung 3.14: Bovine RPE Zellen entwickelten im Kulturverlauf auf allen Biomaterialien konfluente Areale, die potentiell für eine Transplantation geeignet sind. Maßstab ≙ 100 µm.

3.3.2 Zellwachstum des bovinen IPEs auf Biomaterialien

Irispigmentepithel Zellen als potentieller Ersatz für RPE Zellen wurden ebenfalls auf den vier Biomaterialien und Glas kultiviert. Nach den ersten vier Tagen in Kultur waren auf allen Materialien einzelne Zellen und kleine Zellverbände adhärent und ausgebreitet (Abbildung 3.15, A-E). Zellen auf den Nanofasern bildeten die Ausnahme mit kugeligen Zellformen (E). Die höchste Zelldichte zeigte sich auf der Glaskontrolle (A).

Im Verlauf nahm die Anzahl ausgebreiteter Zellen deutlich zu, so dass nach sieben Tagen sowohl auf Glas als auch auf Kollagen mehrere Zellareale mit hexagonaler Morphologie zu sehen waren (F, G). Anders als bei RPE Zellen wiesen die IPE Zellen aber noch keine Konfluenz über das gesamte Substrat auf. Die Zelldichte auf der Amnionmembran war insgesamt geringer als auf Glas und Kollagen (H). Auch auf Seide und PLLA Fasern erhöhte sich die Zelldichte nur leicht. Die Zellen auf der Seidenmembran formten Ausläufer vor allem in lockeren Zellverbänden (I), wohingegen die Zellen auf den Fasern hexagonal ausgebreitet waren, aber nur einen Teil der Vliese besiedelten (J).

Nach elf Tagen Kultur breiteten sich die Zellaggregate auf Glas und Kollagen in sehr ähnlicher Weise aus und besiedelten große Flächen des Substrates (K und L). Zudem gab es einige lockere Zellverbände. Die Morphologie erschien aufgrund unterschiedlich intensiver Pigmentierung insgesamt inhomogener als bei RPE Zellen. Auf Amnion waren weiterhin kleinere Teilbereiche der Membran besiedelt (M). Obwohl die Zellen auf Seide nicht annähernd konfluent waren, begannen sie innerhalb von Verbänden, wie auch die RPE Zellen zu dieser Zeit, zu kontrahieren. Auf den Nanofasern stieg die Zelldichte weiter leicht an, so dass die Zellverbände sich vergrößerten und zudem eine epitheliale Morphologie aufwiesen (O).

Innerhalb der nächsten Tage ließ sich eine Kontraktion der IPE Zellen vom Rand des Glases beobachten, wobei sich die Morphologie des übrigen Zellrasens nicht änderte.

An Tag 18 besiedelten IPE Zellen auf Amnion weiterhin etwa die Hälfte des Materials und die Zellmorphologie innerhalb dieser Bereiche war homogen (R). Auf Kollagen demonstrierten die Zellen fortwährend einen subkonfluenten Zellrasen (Q), IPE Zellen auf Glas und Seidenmembran dagegen kontrahierten weiterhin in Teilbereichen (P, S). Zellen auf den Nanofasern zeigten einen leichten Anstieg in der Zelldichte, der jedoch auf Teilbereiche der Vliese beschränkt blieb (T).

Bis zum Ende der Kulturdauer nach vier Wochen nahm die Zelldichte weder auf den Biomaterialien noch auf Glas weiter zu. Im Vergleich zu RPE Zellen zeigte sich auf Amnion zwar kein Zellzuwachs, aber auch kein Herauslösen einzelner Zellen aus dem Verband.

Obwohl im Vergleich zu RPE Zellen die Dichte der IPE Zellen auf allen Materialien stets geringer war, entwickelten sich auf allen vier Biomaterialien kleine konfluente Areale, die für eine Zelltransplantation geeignet sind (Abbildung 3.16).

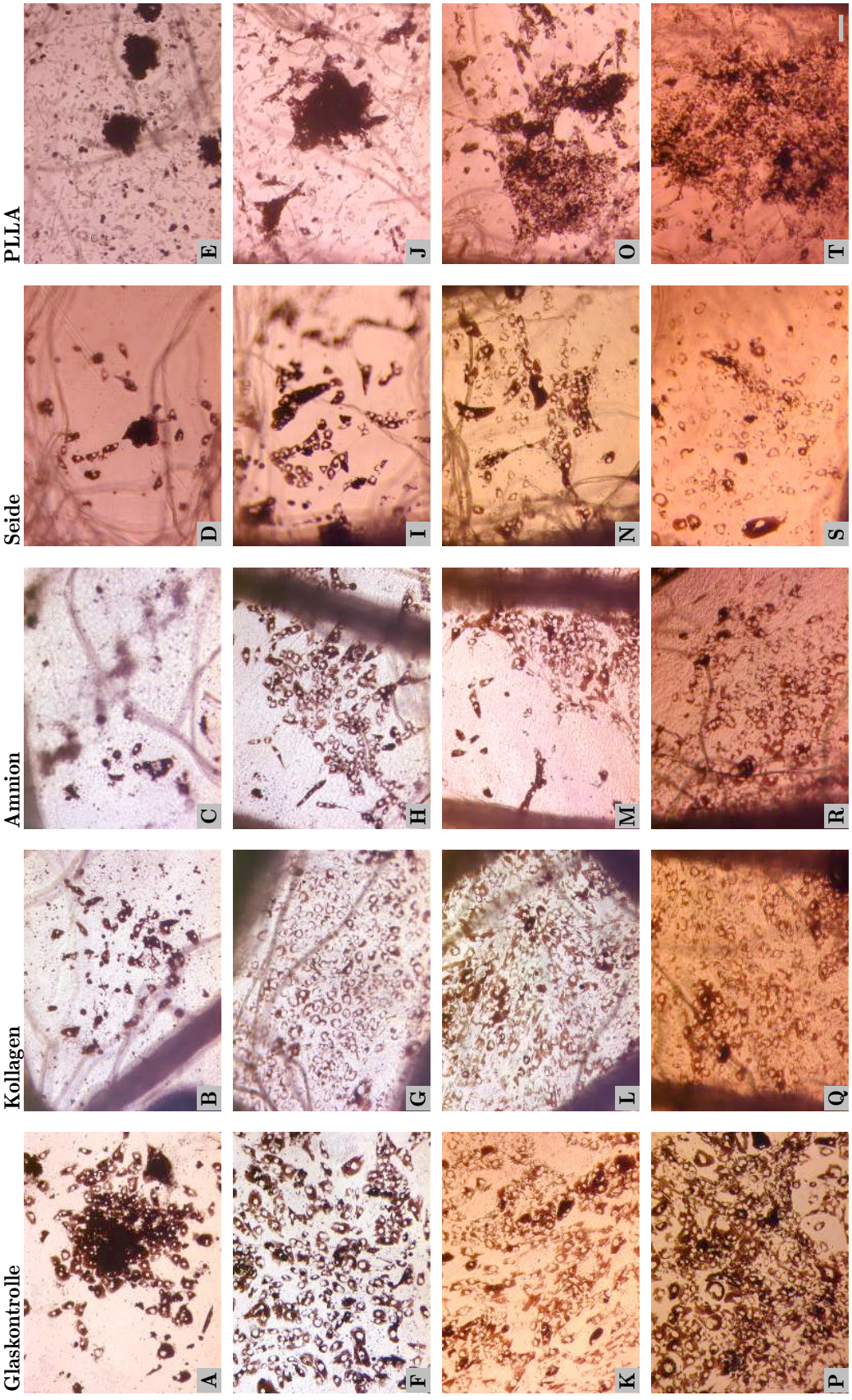


Abbildung 3.15: Morphologie der bovinen IPE Zellen im Kulturverlauf auf Biomaterialien und der Glaskontrolle; nach 4 Tagen (A-E), 7 Tagen (F-J), 11 Tagen (K-O) und 18 Tagen (P-T). Da während dieser Kultivierung die Biomaterialien in *cell crowns* mit einer Lage Gaze stabilisiert wurden, sind zum Teil Fasern der Gaze auf den Abbildungen zu sehen (z.B. B, H, N, E). Maßstab $\widehat{=}$ 100 µm.

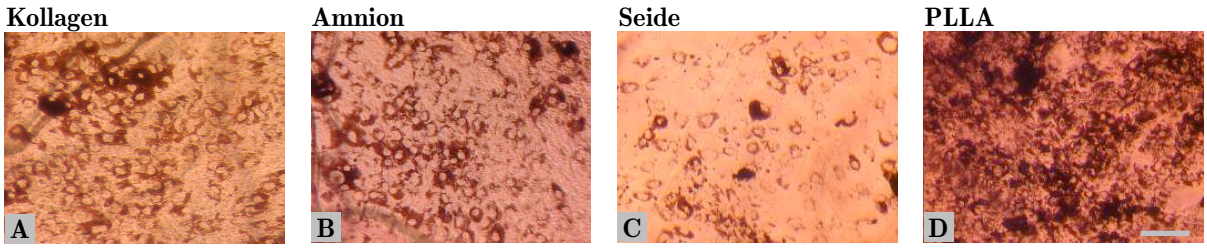


Abbildung 3.16: Bovine IPE Zellen entwickelten im Kulturverlauf auf allen Biomaterialien konfluente Areale, die potentiell für eine Transplantation geeignet sind. Maßstab ≙ 100 µm.

3.3.3 Vitalität von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien

Mittels Vitalfärbung wurde eine klare Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen erreicht. Vitale Zellen besitzen eine intakte Plasmamembran, deren gebundene Enzyme den Farbstoff Fluoreszeindiacetat umsetzen und so eine grüne Fluoreszenz bewirken. Bei nekrotischen oder toten Zellen wird die Membran permeabel, so dass die zweite Färbekomponente Ethidiumbromid durch die Zellmembran diffundieren und in die DNA im Zellkern interkalieren kann. Die Kerne dieser Zellen fluoreszieren rot.

Nach einem Tag Kultur waren alle ARPE-19 Zellen auf der Glaskontrolle adhärent und vital, was durch die grüne Fluoreszenz deutlich wurde (Abbildung 3.17). Einige Zellgruppen mit bis zu zehn Zellen ordneten sich auf den Glasplättchen an (A) und waren überwiegend ausgebreitet. Die Zelldichte zeigte nach zwei Tagen (F) einen deutlichen Anstieg. Alle Zellen waren vital und nur noch wenige Zellen ohne Kontakt zu Nachbarzellen; die Größe der Zellverbände war deutlich erhöht. Einen durchweg konfluenten und vitalen Zellrasen auf den Glasplättchen bildeten ARPE-19 Zellen nach einer Kulturdauer von sechs Tagen (K). Eine Mehrfachschichtung von Zellen wurde nicht beobachtet und die Zellmorphologie zeigte sich hexagonal, wie es charakteristisch für Epithelzellen ist.

Auch auf Kollagen waren nach einem Tag Kultur alle Zellen vital, adhärent und weitestgehend ausgebreitet (B). Die Zelldichte ähnelte den Zellen auf Glas sehr, jedoch lagen die Zellen häufiger einzeln vor. Nach zwei Tagen Kultivierung war die Zelldichte weiterhin gleich zu den Zellen auf Glas (G). Die meisten Zellen ordneten sich nun in Zellgruppen oder lockeren Verbänden an und zeigten eine epitheliale Morphologie. Selten waren in einem Bildausschnitt ein bis zwei tote Zellen zu beobachten. Auch nach sechs Tagen verlief die Kultivierung der ARPE-19 Zellen auf Kollagen wie auf Glas. Die Zellen waren konfluent ohne Ausbildung von Multischichten und wiesen eine ununterbrochen gute Morphologie auf. Nur vereinzelt fand sich zu diesem Zeitpunkt eine tote Zelle im Zellrasen (L).

Zellen auf humaner Amnionmembran demonstrierten initial eine deutlich geringere Zelldichte als auf Kollagen bzw. Glas (C). Die meisten Zellen waren adhärent, jedoch nicht ausgebreitet, wodurch ihre Morphologie kugelig erschien. Tote Zellen wurden vereinzelt auf dem Material gefunden, vitale Zellen überwogen diese jedoch um ein Vielfaches. Trotz rot leuchtender Artefakte des Amnions, welche auf die manuelle Epithelentfernung zurückzuführen sind, ließen sich die roten Zellkerne anhand der Intensität und Größe gut identifizieren (C).

Nach zwei Tagen Kultivierung bildeten sich Konglomerate aus ausgebreiteten Zellen (H), die sehr ähnlich zu Zellen auf Glas waren. Die Zelldichte auf Amnion entsprach in den meisten Teilen der auf Glas und Kollagen, jedoch lagen auf Amnion wieder einzelne tote Zellen vor. Innerhalb der sechs Tage Kultivierungszeit bildete sich auch auf Amnion ein konfluenter, vitaler Zellrasen, in dem einige tote Zellen verteilt vorkamen (M).

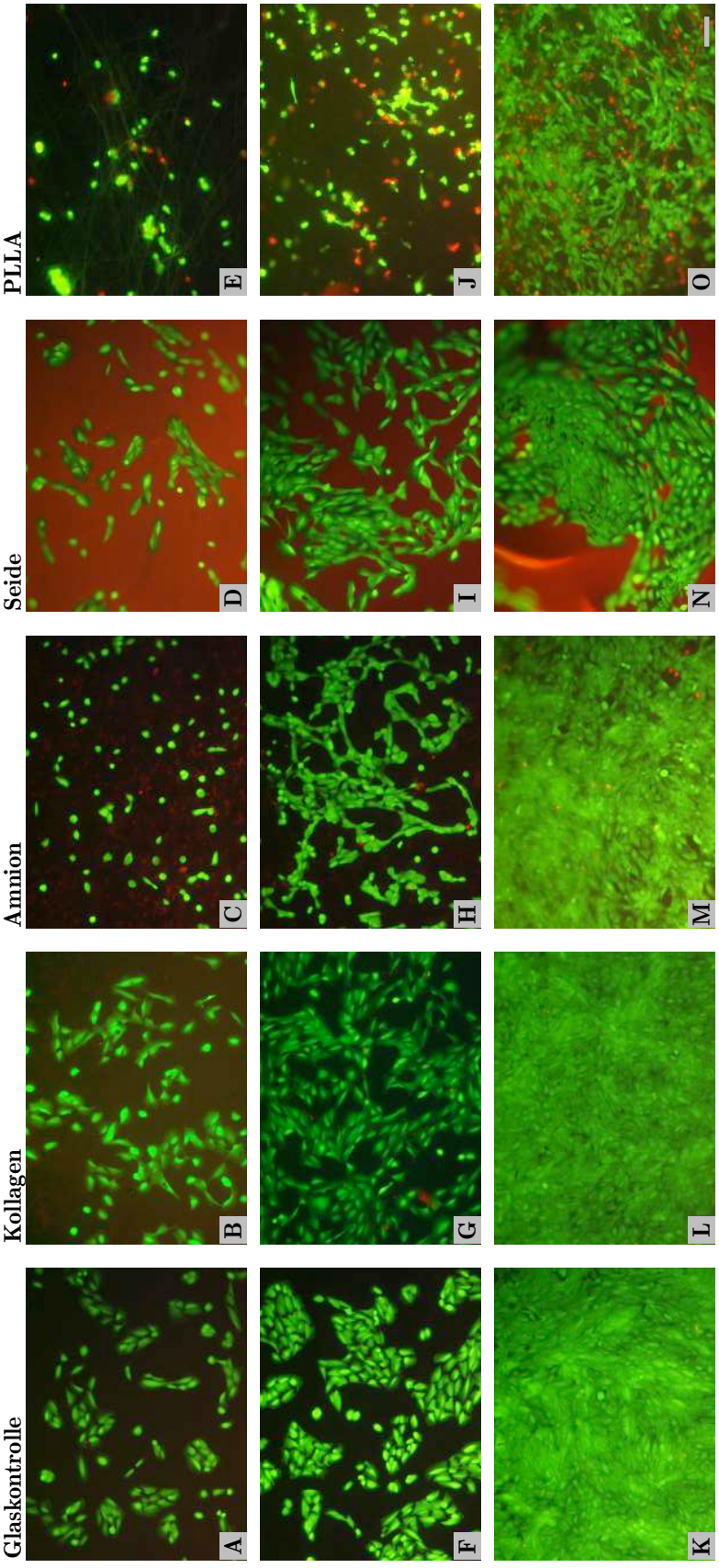


Abbildung 3.17: Vitalfärbung von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialen und der Glaskontrolle nach einem Tag (A-E), zwei Tagen (F-J) und sechs Tagen Kultivierung (K-O). Vitale Zellen sind grün angefärbt, die Zellkerne toter Zellen leuchten rot. Aufgrund der Autofluoreszenz der Seide (D, I, N) leuchtet die Membran orange-rot. Maßstab $\widehat{=}$ 100 µm.

Auf den Membranen aus Seide entwickelten ARPE-19 Zellen innerhalb der sechs Tage in Kultur keinen konfluenten Zellrasen. Nach einem und zwei Tagen waren alle Zellen vital und ihre Morphologie zeigte sich ausgebreitet, epithelial und sehr ähnlich zu Zellen auf Kollagen und Glas. Die Zelldichte auf Seide war zunächst geringer (D), nach zwei Tagen aber an die Zellen auf Kollagen und Glas angeglichen (I). Es wurden keine toten Zellen beobachtet. Die Zellen orientierten sich zum Teil entlang von kleinen Falten, die sich im Material gebildet hatten. Nach sechs Tagen zeigten die Zellen weiterhin eine hexagonale Morphologie, entwickelten jedoch nur große Zellverbände bzw. dichte Areale auf der Seidenmembran (N).

Auf PLLA Vliesen zeigten die Zellen einen Tag nach Aussaat die geringste Zelldichte (E). Die Zellmorphologie war überwiegend kugelig und etwa ein Fünftel der Zellen zeigten aufgrund von Apoptose einen roten Zellkern. Nach zwei Tagen Kultivierung nahm die Zelldichte deutlich zu, war im Vergleich zu den anderen Materialien jedoch weiterhin geringer. Die Zellen standen selten in Zell-Zell-Kontakt und waren in unterschiedlichen Fokusebenen zu finden, was auf die maschenartige Struktur des Vlieses zurückzuführen war. Die Morphologie zeigte sich überwiegend kugelig oder entlang einer Faser orientiert (J). Die Rate an toten Zellen führte sich im Vergleich zu Tag eins fort und war auch nach sechs Tagen Kultur in erhöhtem Maße zu finden. Die Zelldichte hatte bis zum letzten Zeitpunkt deutlich zugenommen und lag mit subkonfluenten Bereichen des Vlieses zwischen derer von Seide und den vollständig bewachsenen Materialien.

3.3.4 Vitalität boviner RPE Zellen auf Biomaterialien

Wie für die Zelllinie wurden Vitalfärbungen auch an primären bovinen RPE und IPE Zellen im Kulturverlauf vorgenommen.

Nach zwei Wochen Kultur demonstrierten RPE Zellen auf Glas, Kollagen, Amnion und Seide eine Vitalitätsrate von annähernd 100% (Abbildung 3.18, A-D). Nur vereinzelt waren tote Zellen in der konfluenten Zellmonoschicht auszumachen. Auf Amnionmembranen war die Zelldichte etwas geringer als auf Kollagen und Glas, da kleine Areale der Membran unbesiedelt waren. Zellen auf Kollagen und Glas bildeten in ähnlicher Weise konfluente Zellrasen, die an eine Hyperkonfluenz der Zellen heranreichten. RPE Zellen auf Seide zeigten die hohe Vitalitätsrate im subkonfluenten Zellrasen auch unter den Zellen, die kontrahiert waren (vgl. Kapitel 3.3.1). Auf den Nanofasern hatten sich ebenfalls subkonfluente Zellrasen gebildet, die jedoch häufiger als Zellen auf Seide von toten Zellen durchsetzt waren (E). Die Morphologie einzelner Zellen orientierte sich entlang der Fasern, zeigte im Verband jedoch eine flächige Formation.

Deutlichere Unterschiede zwischen den Kulturen auf Biomaterialien ergaben sich nach drei Wochen Kultur. Auf Amnion waren viele Zellkerne toter Zellen zu erkennen, deren Verteilung sich über den gesamten Zellrasen erstreckte (H). Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Konfluenz noch nicht über die gesamte Membran ausgedehnt. Auf der Glaskontrolle waren zwar weiterhin nur vereinzelt tote Zellen zu beobachten, die Morphologie des Zellrasens erwies sich jedoch inhomogen durch Zellaggregate, die sich auf der Monoschicht gebildet hatten und in der grünen Fluoreszenz intensiver leuchteten als die übrigen Zellen (F). Dagegen behielten Zellen auf Kollagen ihre bisherigen Merkmale eines konfluenten Zellrasens mit annähernd 100%iger Vitalität bei (G).

Zellen auf Seidenmembranen zeigten nach drei Wochen Kultur einen deutlichen Anstieg in der Anzahl toter Zellen (I). Ein Teil der Zellen kontrahierte weiterhin, die Morphologie der noch ausgebreiteten Zellen blieb jedoch hexagonal. Die Dichte des Zellrasens erschien aufgrund der Kontraktion nicht mehr subkonfluent wie nach zwei Wochen Kultur. Auch auf den PLLA Nanofasern stieg die Rate der toten Zellen im Vergleich zur ersten Vitalfärbung deutlich an. Dennoch überwogen auf den Vliesen die vitalen Zellen und demonstrierten subkonfluente Zellverbände (J).

Zum Ende der Kultivierung nach vier Wochen (K-O) traten kaum Veränderungen des

Abbildung 3.18: Vitalfärbung von bovinen RPE Zellen auf Biomaterialen und der Glaskontrolle nach 14 Tagen (A-E), 21 Tagen (F-J) und 28 Tagen Kultivierung (K-O). Vitale Zellen sind grün angefärbt, die Zellkerne toter Zellen leuchten rot. Aufgrund der Autofluoreszenz der Seide (D, I, N) leuchtet die Membran orange-rot. Maßstab $\hat{=}$ 100 µm.

Gesamtbildes aller Kulturen auf. Sowohl auf Glas als auch auf Amnion kontrahierten Teile des RPE Zellrasens und lösten sich vom Untergrund ab. Die Vitalitätsrate auf der Kontrolle war jedoch höher als auf Amnion (K). Hier führte sich die Verschlechterung der Vitalität mit einigen toten Zellen innerhalb des kontrahierten Zellrasens fort, der zum Teil auch Überlagerungen von Zellen bildete (M). Die RPE Zellen auf Kollagen dagegen demonstrierten auch nach vier Wochen einen homogenen, konfluenten und vitalen Zellrasen mit weitestgehend hexagonaler Morphologie (L). Auf Seide erschien die Anzahl toter Zellen etwas weniger als in der Woche zuvor, die Zellen kontrahierten aber weiterhin auf dem Material (N). RPE Zellen auf den Nanofasern hielten den subkonfluenten Status bei und zeigten insgesamt ein homogenes Bild (O). Die Vitalitätsrate auf den Fasern hatte sich im Vergleich zu drei Wochen leicht verschlechtert.

3.3.5 Vitalität boviner IPE Zellen auf Biomaterialien

Die erste Vitalfärbung von Irispigmentepithel Zellen nach 14 Tagen zeigte wie das RPE eine fast 100%ige Vitalitätsrate der Zellen auf allen Materialien (Abbildung 3.19). Auf der Glaskontrolle und der Kollagenfolie bildeten die Zellen auf etwa drei Viertel der Fläche einen nahezu konfluenten Zellrasen; nur kleine Lücken, vor allem auf Kollagen, wurden beobachtet (A, B). Die Zellgrößen in diesem Verband waren bei beiden Materialien inhomogen, da einzelne, sehr große Zellen zwischen den übrigen, deutlich kleineren Zellen vorlagen. Die Zellmorphologie am Rand von initialen Zellverbänden war elongierter als in konfluenten Bereichen, denn die Zellen wuchsen aus diesen Zellgruppierungen heraus. Eine sehr hohe Vitalitätsrate, wenn auch bei geringerer Zelldichte, zeigten Zellen auf Amnion (C). Auch auf Seide waren die Zellen mit wenigen Ausnahmen vital. Sie besiedelten etwa ein Drittel des Materials mit kleinen dichten Bereichen (D). Innerhalb dieser war die Morphologie hexagonal, in lockeren Zellverbänden jedoch überwiegend langgestreckt. Häufig kontrahierten die Zellen am Rand der Verbände wie schon in der Durchlichtmikroskopie beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 3.3.2). Auf den PLLA Fasern war die Anzahl toter Zellen am höchsten, wobei die Vitalitätsrate dennoch höher war als bei RPE Zellen (E). Die Zelldichte entsprach etwa der von Zellen auf Seide, denn einzelne Zellgruppen und kleine konfluente Areale waren zu erkennen.

Nach drei Wochen ergab die Färbung eine fast 100%ige Vitalitätsrate der Zellen auf allen Materialien, nur selten kamen einzelne tote Zellen vor (F-I). Im Gegensatz zu den RPE Zellen zeigten IPE Zellen auch auf Amnion keine Apoptose. Eine vollständige Konfluenz wurde zu diesem Zeitpunkt weiterhin auf keinem Material erreicht. Auf Glas und Kollagen waren die Zellen wie schon nach 14 Tagen subkonfluent, wogegen das Zellwachstum auf Amnion auf einige Bereiche und insgesamt auf die Hälfte der Membran beschränkt blieb. Die Zellmorphologie erwies sich hier als heterogener als auf Kollagen und Glas. Auf Seide änderte sich das Bild, denn der Zellrasen kontrahierte und gab viel Membranfläche frei. Auf den Nanofasern blieben die Zellen und die Vitalitätsrate ähnlich wie nach 14 Tagen Kultur, morphologisch trat das Phänomen von Membranausstülpungen (sog. *Blebbing*) auf. Die Zelldichte zu diesem Zeitpunkt war deutlich niedriger als bei RPE Zellen.

Die Vitalfärbung zum Abschluss der Kultur reproduzierte das Ergebnis nach drei Wochen mit Ausnahme der Zellen auf Seide (L-O). Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der Anzahl toter Zellen (N). Auf den übrigen Materialien stellte sich die Vitalitätsrate und Morphologie weiterhin gut dar.

Zusammenfassend wurde weder auf den Biomaterialien noch auf der Glaskontrolle innerhalb eines Monats eine vollständige Konfluenz erreicht, jedoch die perfekte Vitalitätsrate gehalten. Die Morphologie auf Glas und Seide wurde durch die zunehmende Kontraktion der Zellen heterogener. Auf PLLA ergab sich insgesamt eine höhere Zelldichte als auf Seide. Auf Kollagen und Glas zeigten die Zellen ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten, wobei die Morphologie auf Kollagen homogener erschien, da die Zellen hier zu keiner Zeit kontrahierten.

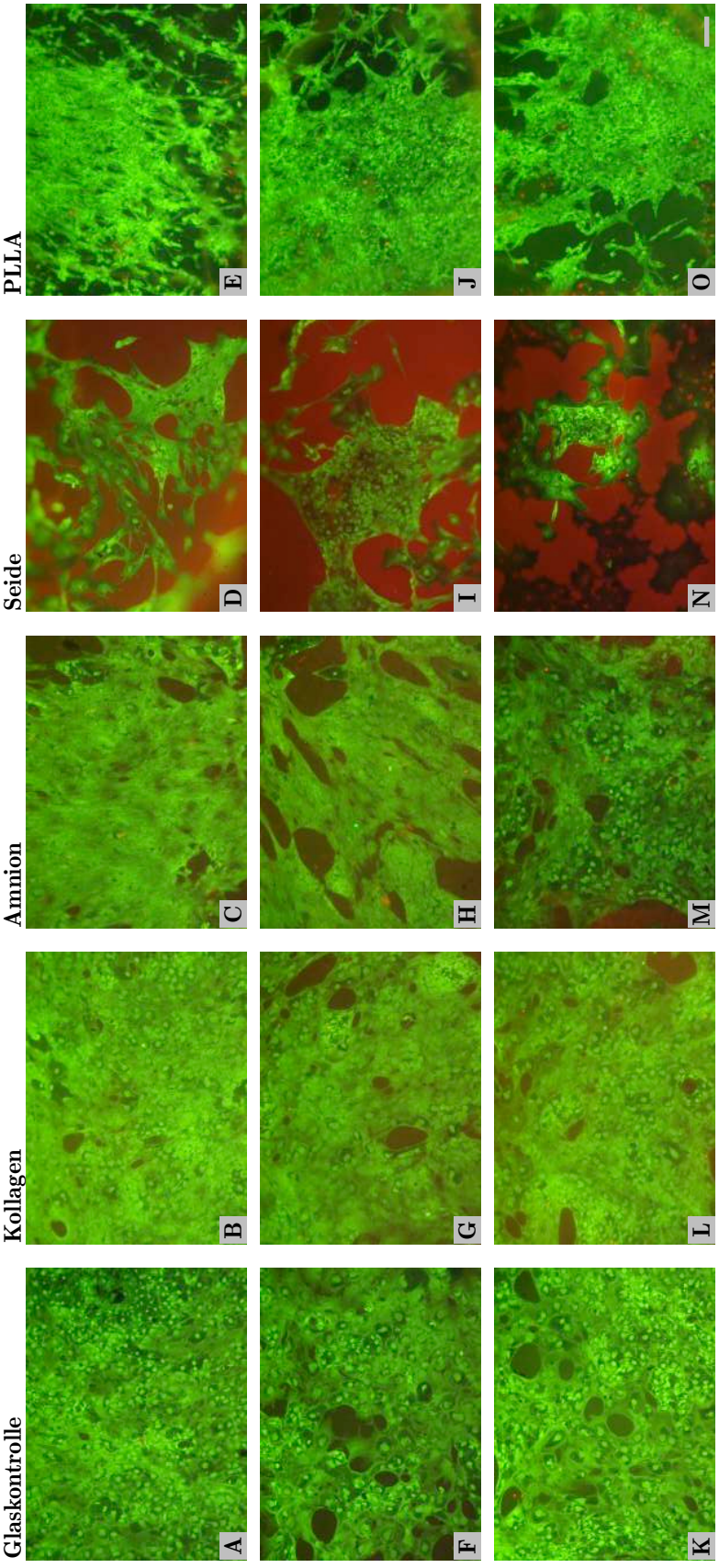


Abbildung 3.19: Vitalfärbung von bovinen IPE Zellen auf Biomaterialen und der Glaskontrolle nach 14 Tagen (A-E), 21 Tagen (F-J) und 28 Tagen Kultivierung (K-O). Vitale Zellen sind grün angefärbt, die Zellkerne toter Zellen leuchten rot. Aufgrund der Autofluoreszenz der Seide (D, I, N) leuchtet die Membran orange-rot. Maßstab $\hat{=}$ 100 µm.

3.4 Immunhistologie von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien

Sowohl die Cytokeratin- als auch die Aktinfärbung war für ARPE-19 Zellen nach Kultivierung auf allen vier Materialien qualitativ nachweisbar (Abbildung 3.20). Negativkontrollen ohne den Primärantikörper zeigten keine Fluoreszenzfärbung.

In Übereinanderlagerung der Aufnahmen der Fluoreszenz des Zielproteins (grün) und der Kernfärbung (rot bzw. blau) wurde deutlich, dass alle Zellen auf den Folien eine positive Cytokeratin und Aktin Proteinbiosynthese aufwiesen. Die Cytokeratin Filamente waren in Zellen auf allen Materialien sehr ähnlich in ihrer charakteristischen Anordnung ausgehend von Bündeln exprimiert.

Die Aktinfärbung machte jedoch deutlich, dass sich die Morphologien der ARPE-19 Zellen abhängig vom Material unterschieden. Zellen auf Kollagen gaben die für Epithelzellen typische hexagonale Kopfsteinpflaster Morphologie der Zellen wider, denn die Aktinfilamente umgaben in Aufsicht die Zellmembran kortikal (Abbildung 3.20, I und M). Ein ähnliches Bild ergab die Aktinmarkierung von Zellen auf Amnionmembran.

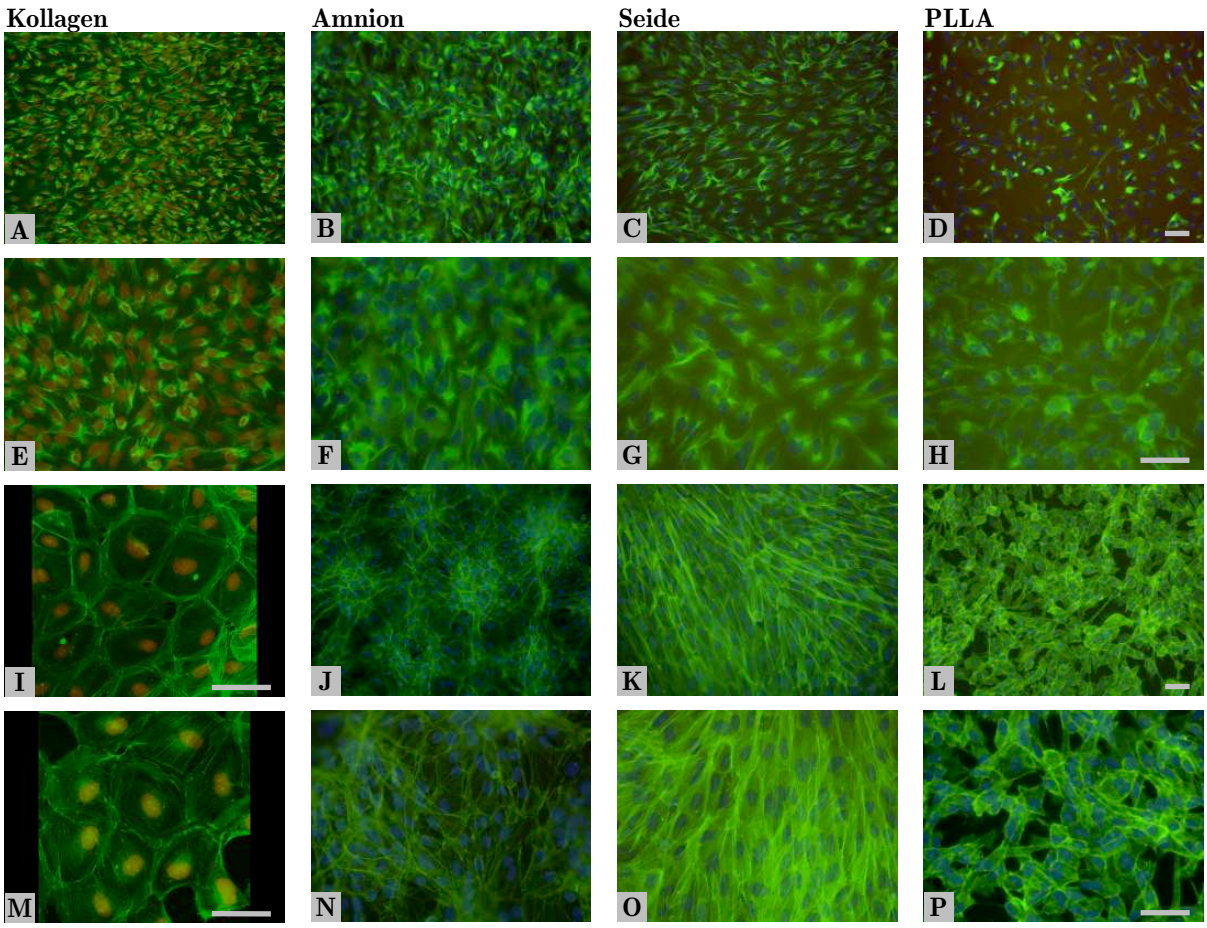


Abbildung 3.20: Immunhistochemische Färbung von Cytokeratin und Aktin Proteinen in ARPE-19 Zellen auf Kollagen-, Amnion- und Seidenmembranen sowie PLLA beschichteten Deckgläschen. A-H stellt die Cytokeratin Expression dar, I-P die Aktin Expression. Die Zellkerne sind DAPI (blau) oder PI (rot) gefärbt. I und M wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen und sind daher in einer anderen Vergößerung dargestellt. Alle aufgeführten Maßstäbe $\widehat{=}$ 50 µm.

Hier wurde vor allem in der Übersicht (J) die gehäufte Anordnung der Zellen in Nestern deutlich, in denen die Zellen zum Teil übereinander wuchsen. Langgestreckte Aktinfasern, die zu Zellen in einer anderen Fokusebene zogen, verdeutlichten dies. Auf Seide waren die Zellen im Vergleich zu den anderen drei Membranen stark elongiert und parallel angeodnet und nicht mehr in der epithelialen, gedrungenen Form. Nicht nur entlang der Zellmembran, sondern auch durch das Zytoplasma waren deutlich parallel ziehende Aktinfasern zu beobachten (O). Diese sog. Stressfasern wurden in allen Zellen des Verbandes auf Seide synthetisiert (K).

ARPE-19 Zellen auf PLLA beschichteten Glasplättchen wuchsen nicht zu einem vollständig konfluenten Zellrasen heran, ihre Aktinexpression entsprach jedoch wieder der kortikalen Anordnung um die hexagonalen Zellen (L und P). Die Zellen waren wie auch auf den Nanofasern in der Zellkultur weniger ausgebreitet als Zellen auf den anderen drei Materialien.

Die Fluoreszenzfärbung mit RPE65 Antikörpern bewies die Expression von RPE65 im Zytoplasma von ARPE-19 Zellen auf allen untersuchten Materialien (Abbildung 3.21, A-H).

Ebenso konnte auf den vier Biomaterialien das Vorhandensein von ZO-1 Proteinen nachgewiesen werden. Eine ununterbrochene ZO-1 Synthese zeigte sich in ARPE-19 Zellen auf

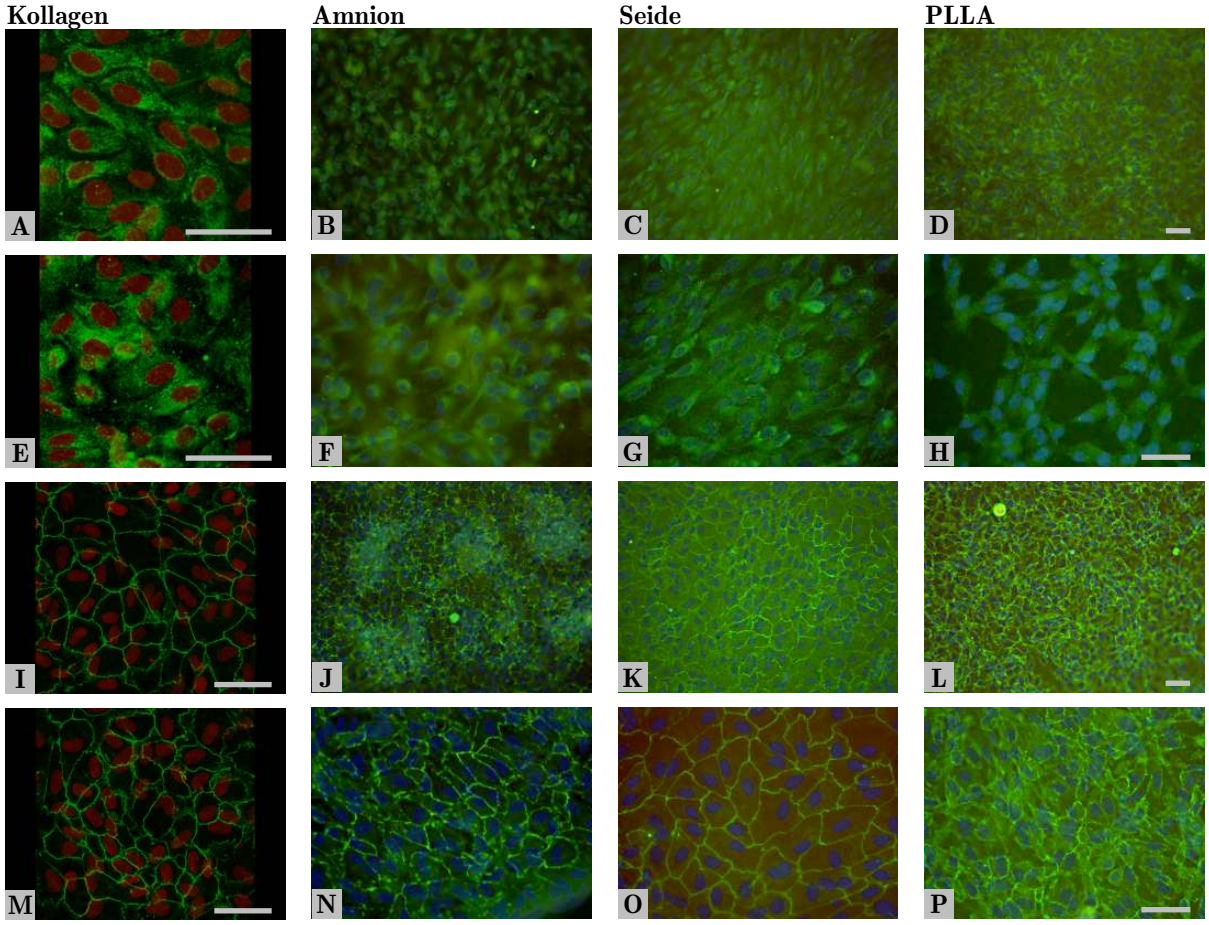


Abbildung 3.21: Immunhistochemische Färbung von RPE65 und ZO-1 Proteinen in ARPE-19 Zellen auf Kollagen-, Amnion- und Seidenmembranen sowie PLLA beschichteten Deckgläschen. A-H stellt die RPE65 Expression dar, I-P die ZO-1 Expression. Die Zellkerne sind DAPI (blau) oder PI (rot) gefärbt. A, E, I und M wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen und sind daher in einer anderen Vergößerung dargestellt. Alle aufgeführten Maßstäbe $\widehat{=}$ 50 µm.

Kollagen (I und M) und Seide (K und O) und betonte einmal mehr die regelmäßige Kopfsteinpflaster Morphologie des Zellverbandes. Auf Amnion exprimierten die Zellen ZO-1 weniger gleichmäßig, denn die Fluoreszenzmarkierung war teilweise unterbrochen. Auf der PLLA Beschichtung erschien die Anordnung der ZO-1 Proteine ebenfalls diskontinuierlicher als auf Kollagen und Seide. In dicht bewachsenen Arealen lagerten sich Zellen auf PLLA übereinander und führten zu einer verschwommenen Fluoreszenzmarkierung (P).

3.5 Widerstandsmessung (TER) von ARPE-19 Zell*sheets*

Eine Widerstandsmessung von Zellkulturen auf PLLA Nanofasern war nicht möglich. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass zu keiner Zeit ein messbarer Widerstand vorlag. Wie bereits anhand der Vitalfärbung beobachtet werden konnte, entwickelten die Zellen auf den Fasern subkonfluente Verbände, aber keinen vollständig geschlossenen Zellrasen (vgl. Kapitel 3.3.3). Daher durchdrang der elektrischer Strom das Zell*sheet* ungehindert und die Messwerte ergaben keinen Unterschied zur Leermessung des Materials.

Die Widerstandswerte von ARPE-19 Zellkulturen auf Kollagen, Amnion, Seide und *Inserts* zeigten einen charakteristischen Verlauf über die Kulturzeit von vier Wochen (Abbildung 3.22). Ein exponentieller Anstieg des Widerstandes wurde von zwei bis sieben Tagen und kontinuierlich von der ersten bis zur zweiten Woche deutlich. Die Maximalwerte wurden abhängig vom Material nach 12 bzw. 14 Tagen gemessen und stabilisierten sich in diesem Bereich in Form einer Plateauphase. Der Stand dieses Plateaus sank in der dritten und vierten Woche zum Teil leicht.

An Tag zwei ergaben sich im Mittel aus drei Versuchsansätzen nur auf Seide und *Insert* bereits messbare Werte (Tabelle 3.3). Ab der zweiten Messung und bis zum Abbruch der Kultur war der Widerstand auf den käuflich erworbenen *Inserts* stets deutlich höher als auf den Biomaterialien. Die Höchstwerte auf *Inserts* erreichten einen Flächenwiderstand (Ωcm^2) von $26,51\ \Omega\text{cm}^2$ nach zwölf Tagen und behielten dieses Niveau auch an Tag 14 bei. Nach drei Wochen waren die Werte leicht gesunken und erreichten nach vier Wochen $22,15\ \Omega\text{cm}^2$.

Für ARPE-19 Zellen auf Amnion wurden die höchsten Widerstände nach zwölf Tagen gemessen. Sie erreichten mit $13,72\ \Omega\text{cm}^2$ 52% des Maximums auf *Inserts*. Auf Amnion sank der Widerstand innerhalb von zwei Tagen auf $10,98\ \Omega\text{cm}^2$, hielt diesen Wert jedoch etwa konstant bis zum Ende der Kulturzeit.

Zellen auf Seide zeigten wie Amnion nach zwölf Tagen Kultivierung den höchsten Widerstand von $10,39\ \Omega\text{cm}^2$ und erreichten somit 39% des Maximums auf *Inserts*. Die Messwerte sanken bis zum Ende der Kultur langsamer, aber im Vergleich zu Amnion tiefer bis auf den geringsten gemessenen Wert von $7,81\ \Omega\text{cm}^2$.

Kollagen präsentierte sich dahingehend anders, dass der Höchstwert etwas später als Amnion und Seide an Tag 14 gemessen wurde. Dieser lag mit $13,16\ \Omega\text{cm}^2$ und 50% des *Insert*-Wertes zwar geringfügig niedriger als das Maximum auf Amnion, hielt jedoch dieses Niveau konstant über eine Plateauphase bis zum Ende der Versuchsdauer.

Zwischen den verschiedenen Biomaterialien ergab sich aufgrund der Standardabweichung kein signifikanter Unterschied in den Widerständen.

Im Anschluss an die Versuchsreihe wurden die Zellen auch immunhistochemisch auf das Vorhandensein von *tight junctions* überprüft. Über die gesamte Fläche aller in der TER verwendeten Materialien wurde das ZO-1 Protein qualitativ nachgewiesen (Abbildung 3.23). Damit bestätigte sich der dichte Zellverband und die messbaren Widerstandswerte der TER Messung. In der Übersicht wirkte die Markierung der *tight junction* Proteine auf Kollagen sehr ähnlich zu den Zellen auf den käuflich erworbenen *Inserts*, denn sie waren gleichmäßig entlang der Zellmembranen lokalisiert und verdeutlichten damit die kopfsteinpflaster-ähnliche Morphologie der Zellen (A und B). Die Färbung auf Amnion schien diffuser, denn durch die bereits

Tabelle 3.3: Widerstandswerte von ARPE-19 Zellen auf *Inserts*, Kollagen, Amnion und Seide über eine Kulturdauer von 28 Tagen. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen und ihre Standardabweichung, die Messwerte der einzelnen Kulturen befinden sich in Tabelle A.5 im Anhang.

	Widerstand [Ωcm^2]			
Tage	***Insert***	**Kollagen**	**Amnion**	**Seide**
2	2,18 ± 1,18	0,31 ± 0,44	0,34 ± 0,38	3,70 ± 2,75
7	21,50 ± 2,85	9,64 ± 2,68	8,28 ± 1,88	6,72 ± 2,19
12	26,51 ± 0,97	12,35 ± 2,27	13,72 ± 2,69	10,39 ± 1,58
14	25,42 ± 1,45	13,16 ± 0,83	10,98 ± 3,77	9,83 ± 1,97
21	23,02 ± 3,93	12,32 ± 3,10	9,64 ± 1,76	9,49 ± 4,05
28	22,15 ± 1,47	12,63 ± 5,64	9,43 ± 2,46	7,81 ± 3,87

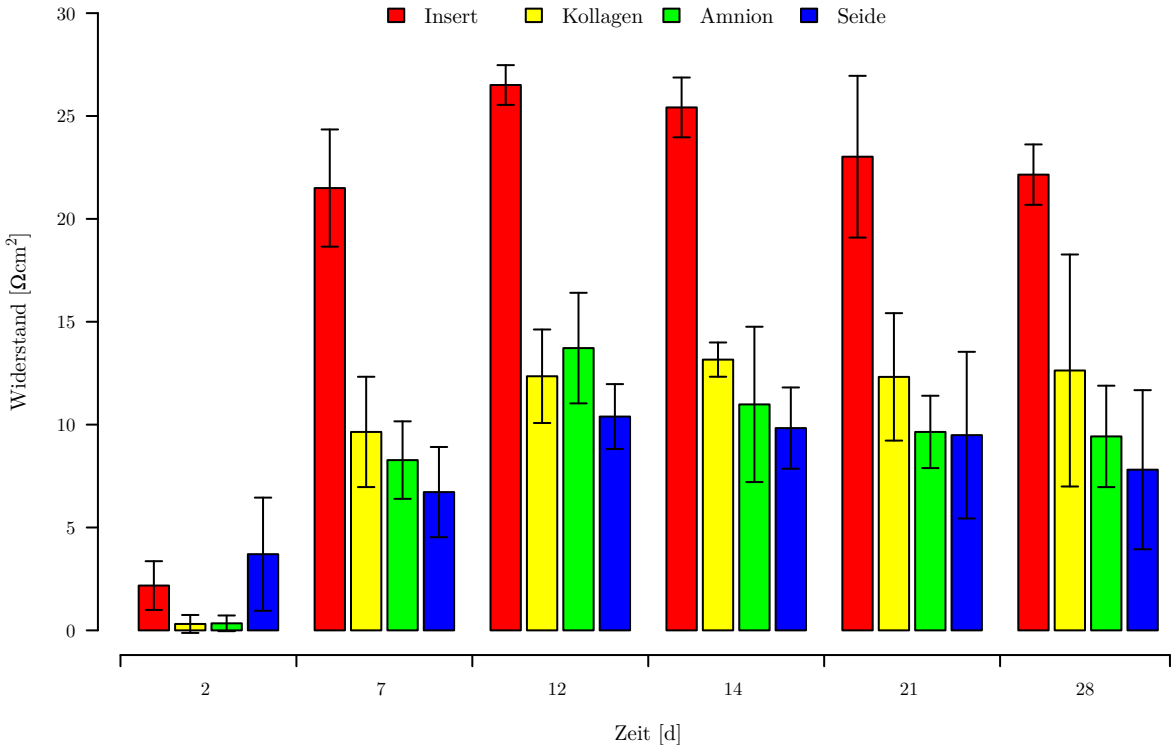


Abbildung 3.22: TER Messung: Widerstände von ARPE-19 Zellen über eine Kulturdauer von 28 Tagen auf *Inserts*, Kollagen-, Amnion- und Seidenmembranen.

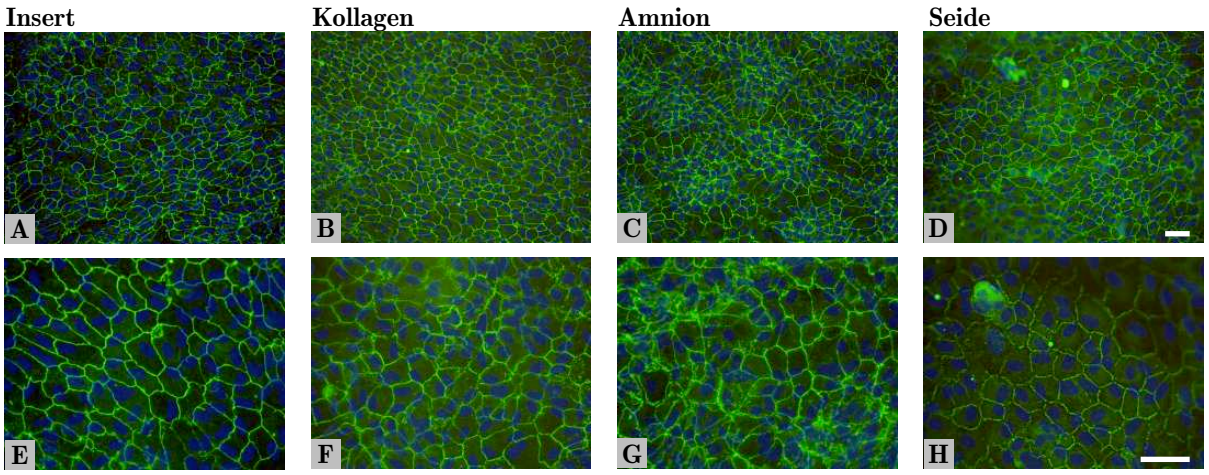


Abbildung 3.23: Immunhistochemische Färbung der *tight junctions* von ARPE-19 Zellen auf den verschiedenen Materialien nach der TER Messung und vier Wochen Kultivierung. ZO-1 = grün, Kernfärbung = blau. Maßstab in D und H $\widehat{=}$ 50 µm.

beobachtete regelmäßige Verdichtung der Zellen lagen die *tight junctions* zum Teil in unterschiedlichen Fokusebenen (C). Ähnlich zeigten sich die ZO-1 Proteine in den Zellen auf Seide; die Unregelmäßigkeiten kamen hier jedoch durch die gewellte Struktur der Folie zustande, welche die Fokussierung eines größeren Areals erschwerte (D).

In der näheren Aufsicht (E-H) ergaben sich Unterschiede in der ZO-1 Synthese und somit in der Feinstruktur der *tight junctions*. Auf *Inserts* und Kollagen waren diese regelmäßig und das ZO-1 wurde kontinuierlich synthetisiert. Bereiche mit unregelmäßiger ZO-1 Expression zeigten sich in ARPE-19 Zellen auf Amnion. Auf Seide wurde die diskontinuierliche Lokalisation des *tight junction* Proteins am deutlichsten, was mit den geringsten Werten der TER Messung übereinstimmte.

3.6 Genexpressionsanalyse von primären RPE und IPE Zellen

3.6.1 Zellkulturen für die RNA Isolation

Für die Genexpressionsanalyse wurden je Zellart drei unabhängige Kulturen auf Kollagen, Amnion, Seide und PLLA im Vergleich zu Kulturen auf Plastik verwendet (siehe Kapitel 2.2.1 und Kapitel 2.2.6). Vor der RNA Isolation wurden die Kulturen lichtmikroskopisch dokumentiert. Die Morphologie der bovinen retinalen Pigmentepithelzellen auf Plastik war nahezu identisch innerhalb aller Kavitäten der Kulturplatte und zwischen den drei Kulturen (Abbildung 3.24, A, F und K). Aufgrund der Zelldichte des konfluenten Zellverbandes zeigte sich in der Aufsicht die für Epithelzellen typische Kopfsteinpflaster Morphologie mit gedrungenen, hexagonalen Zellen. Die Pigmentierung der Zellen war gleichmäßig in allen Kulturen. Aus der RNA Isolation ergab sich eine Konzentration an Gesamt-RNA mit sehr ähnlichen Werten in den ersten beiden Kulturen (Tabelle 3.4). Die höhere Konzentration der dritten Kultur resultierte aus einem anderen Verhältnis von Lysepuffer zur Zellzahl sowie der Anzahl der verwendeten Isolierungssäulen.

RPE Zellen auf Kollagen entwickelten in zwei der drei Kulturen ebenfalls einen lückenlosen Zellverband innerhalb der zweiwöchigen Kultivierung. In einer der Kulturen war die Konfluenz nicht auf allen der sechs besiedelten Membranen zu finden, jedoch große Areale wiesen die hohe Zelldichte auf. Daraus ergab sich die leicht geringere Konzentration der Gesamt-RNA in

der ersten Kultur im Vergleich zu den beiden folgenden Kulturen. Einige Zellen waren stärker pigmentiert als die Mehrheit der Zellen, so dass das Gesamtbild nicht so homogen erschien wie auf Plastik (Abbildung 3.24, B, G und L).

Die Kultivierung auf Amnion resultierte in sehr gleichmäßigen Zellverbänden innerhalb der Kultur. Zwischen den drei Ansätzen gab es Unterschiede in der Pigmentierung; die zweite Kultur erschien dunkler als die beiden anderen. Da die Menge der Gesamt-RNA nach der ersten Kultur auf sechs Membranen sehr gering war, wurden die noch folgenden Kulturen auf zwölf Membranen ausgesät. Daraus resultierte auch die höhere Gesamt-RNA Konzentration der zweiten und dritten Kultur.

Das Zellwachstum auf Seide war im Vergleich der drei Präparationen sehr unterschiedlich. Die erste Kultur entwickelte einen konfluenten, homogenen Zellrasen sehr ähnlich zu den anderen Materialien (Abbildung 3.24,D). Die RNA Ausbeute bestätigte die hohe Zelldichte der Zellen. Die Aussaat von RPE in der zweiten und dritten Kultur erfolgte auf einer anderen Fertigungsauflage an Seidenmembranen als die erste Kultur. Dies wurde unter anderem durch die Zeichnung der Folien mit unregelmäßigen Linien deutlich (I). In der zweiten Präparation wuchsen die Zellen zu einem subkonfluenten Verband mit unregelmäßiger Zellmorphologie und Pigmentierung heran und führten zu einer adäquaten Ausbeute an RNA. In der dritten Kultur wiesen die Zellen eine deutlich geringere und inhomogenere Zelldichte auf. Die Größe der einzelnen Zellen war kleiner als die der vorangegangenen Präparationen. Da nur Teilbereiche der Seidenmembranen mit Zellen besiedelt waren (N), resultierte auch die RNA Isolation in einer niedrigen Konzentration. In weiteren Kulturen auf Seidenmembranen adhärierten RPE Zellen zwar, breiteten sich jedoch nicht oder in nur kleinen Verbänden aus, so dass diese dritte Kultur trotz Abweichungen mit in die Genexpressionsanalyse aufgenommen wurde.

Die Zellaussaat von RPE auf PLLA Nanofasern führte in keiner der drei Kulturen zu einer vollständigen Konfluenz der Zellen. Nach der ersten Präparation bildeten die Zellen große Aggregate in verschiedenen Ebenen des Fasernetzes und zeigten eine ausgebreitete Morphologie und Pigmentierung (Abbildung 3.24, E). Zum Teil sind in den Aufnahmen E, J und O Fasern der Gaze zu sehen, die als Stabilisierung unter den Nanofasern mit in die *cell crowns* eingespannt wurde. Die nachfolgenden Kulturen wurden jeweils auf neuen Fertigungsauflagen an Nanofasern ausgesät. Dies resultierte in geringeren Zelldichten und nur kleinen Zellgruppen auf Teilen der Faservliese (J, O). Die Zellen innerhalb eines solchen Verbandes zeigten mehrheitlich ausgebreitete Zellformen, einige Zellen blieben aber auch kugelig und erschienen daher dunkler. Entsprechend der Zelldichte auf den jeweils zehn besiedelten PLLA Vliesen war die isolierte Gesamt-RNA in der zweiten und dritten Kultur weniger konzentriert als in der ersten Präparation.

Bovine Irispigmentepithel Zellen entwickelten in Plastikschalen dichte Zellverbände ausgehend von einem oder mehreren Zellverbänden, die in den ersten Tagen nach Aussaat adhärierten und sich ausbreiteten. Die Morphologie konnte wie auch bei RPE Zellen als Kopfsteinpflaster Struktur beschrieben werden (Abbildung 3.25, A, F und K). IPE Zellen waren jedoch deutlich dunkler pigmentiert als RPE Zellen. Zum Rand eines konfluenten Areals hin ließ diese Pigmentierung meist leicht nach und wirkte hier gleich zu RPE Zellen (K). In allen drei Kulturen wurde zwar keine vollständige Konfluenz in der Kulturschale erreicht, die Zellen besiedelten jedoch große Bereiche bis hin zur Subkonfluenz. Die Zellmorphologie zeigte zwischen den drei Präparationen eine große Konsistenz. Die unterschiedlichen Ausbeuten an Gesamt-RNA nach der Isolation resultierten aus der Isolation selbst, bei der unterschiedliche Anzahlen an Isolierungssäulen je Kultur verwendet wurden und in der dritten Kultur die doppelte Anzahl an Kavitäten der Kulturschale vorlag (Tabelle 3.4). Kulturen von IPE auf Kollagen waren in der Morphologie und Pigmentierung sehr ähnlich zu den Kontrollkulturen auf Plastik. Eine Konfluenz auf der gesamten Folie wurde in keiner Kultur erreicht, jedoch entwickelten sich aus den Präparationen eins und drei große lückenlose Zellverbände (Abbildung 3.25, B und L) über etwa drei Viertel der

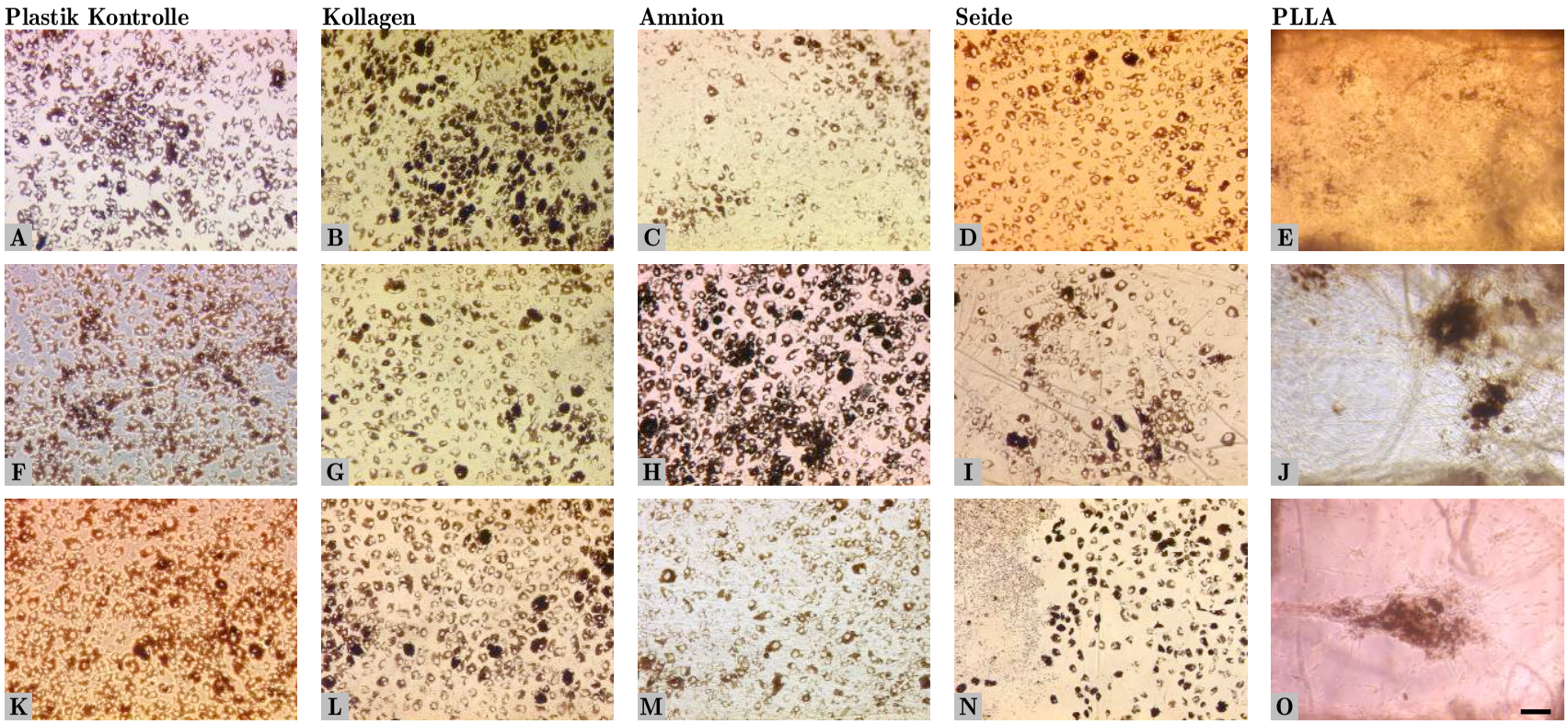


Abbildung 3.24: Primäre bovine RPE Zellen vor der Isolation der Gesamt-RNA nach 14 Tagen Kultivierung. Pro Material wurden drei unabhängige Kulturen präpariert und ihre Morphologie dokumentiert. Jede Zeile entspricht einer Kultur (Kultur 1 = A-E, Kultur 2 = F-J und Kultur 3 = K-O), jede Säule den drei Ansätzen pro Biomaterial. Maßstab $\widehat{=}$ 100 µm.

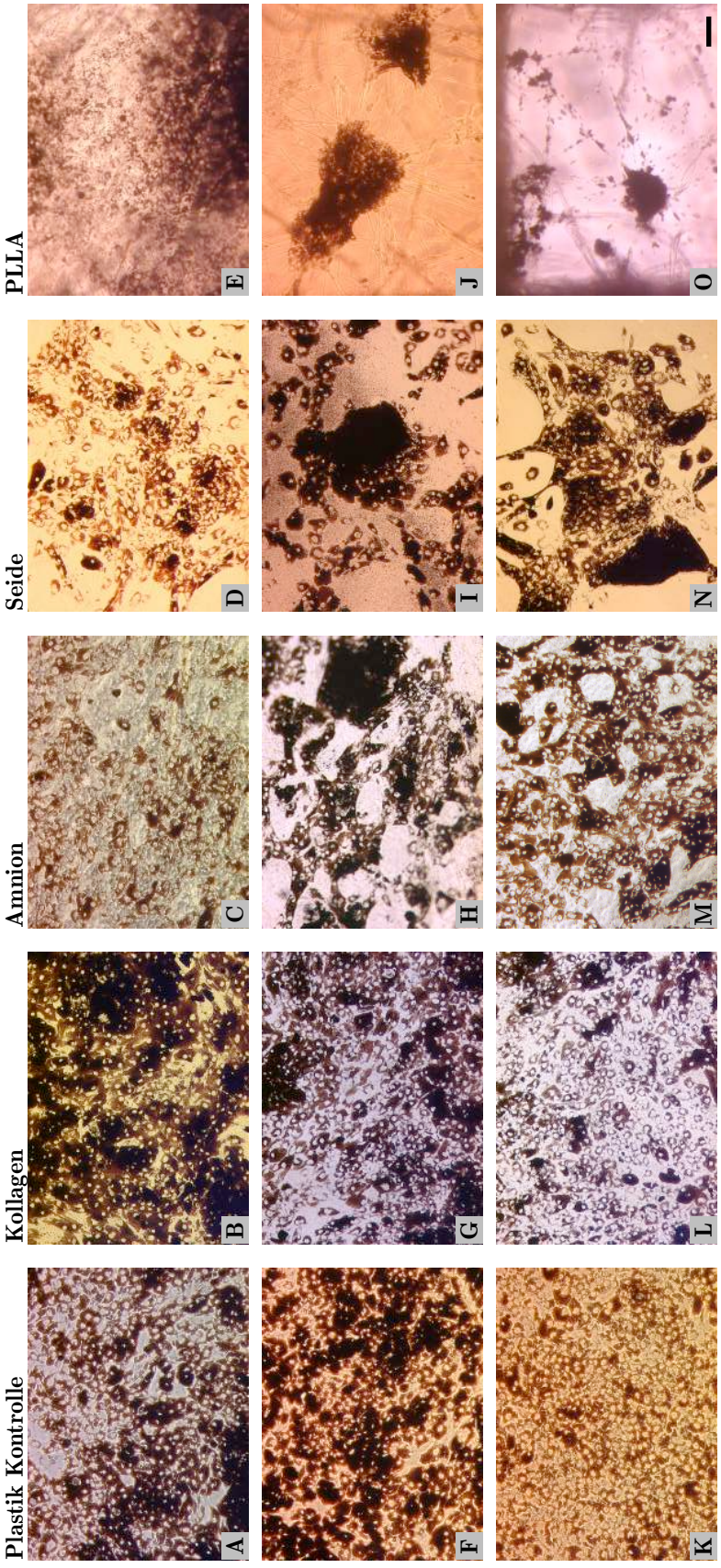


Abbildung 3.25: Primäre bovine IPE Zellen vor der Isolation der Gesamt-RNA nach 14 Tagen Kultivierung. Pro Material wurden drei unabhängige Kulturen präpariert und ihre Morphologie dokumentiert. Jede Zeile entspricht einer Kultur (Kultur 1 = A-E, Kultur 2 = F-J und Kultur 3 = K-O), jede Säule den drei Ansätzen pro Biomaterial. Maßstab ≙ 100 µm.

Tabelle 3.4: RNA Konzentrationen nach Isolation der Gesamt-RNA aus primären bovinen RPE und IPE Zellen nach 14 Tagen Kultur auf Plastik und den verschiedenen Biomaterialien.

		RNA Konzentration [ng/µl]		
Zellart	**Material**	**1. Kultur**	**2. Kultur**	**3. Kultur**
bRPE	Plastik	357,23	347,27	596,19
	Kollagen	154,13	266,90	214,14
	Amnion	64,79	480,49	416,15
	Seide	478,46	224,53	84,99
	PLLA	580,40	266,57	353,16
bIPE	Plastik	276,87	424,63	682,08
	Kollagen	193,88	55,93	220,74
	Amnion	84,51	109,60	150,14
	Seide	218,10	69,50	145,90
	PLLA	176,28	220,76	53,59

Folienfläche. Die Zelldichte der zweiten Kultur war geringer, was sich auch in der Konzentration der isolierten RNA widerspiegelte (G).

Für IPE Kulturen auf humanem Amnion wurden unterschiedliche Spendermembranen verwendet. In der ersten Kultur waren die Zellen wie auch auf Kollagen zu etwa drei Viertel konfluent und demonstrierten eine hexagonale Morphologie und homogene Pigmentierung (Abbildung 3.25, C). Da zunächst nur sieben Amnionstücke für die Zellkultur benutzt wurden, ergab sich nach der Isolation eine geringe RNA Ausbeute. In den folgenden Ansätzen wurden deshalb zwölf Folien verwendet. Obwohl die Zellen hier keine Konfluenz entwickelten sondern lockere Zellverbände, war die Konzentration an Gesamt-RNA höher (H und M).

Innerhalb der drei Ansätze auf Seide zeigten die Zellen eine sehr ähnliche Morphologie. Es gab einige Zellaggregate und lockere Verbände, jedoch keine annähernd konfluenten Areale wie auf Amnion oder Kollagen (Abbildung 3.25, D, I und N). In einzelnen Verbänden hatten sich Zellen im Kulturverlauf kontrahiert, was sich als dunkle und ununterbrochene Flächen auf der Membran widerspiegelte (N). Obwohl für die Präparationen die gleiche Fertigungsauflage an Seidenmembranen verwendet wurde, wiesen die Kulturen unterschiedliche Zelldichten auf, was in großen Schwankungen der erhaltenen RNA Konzentrationen resultierte.

Wie bei den RPE Kulturen wurden für die IPE Kulturen drei unterschiedliche Fertigungsauflagen an PLLA Vliesen eingesetzt. Die erste Kultur erreichte die höchte Zelldichte in größeren Bereichen mit hexagonalen Zellformen. Auf den PLLA Fasern der zwei folgenden Kulturen wiesen IPE Zellen nur kleine Verbände über das Vlies verteilt auf. Im dritten Ansatz führte dies zu der geringsten Ausbeute der RNA Isolation insgesamt.

3.6.2 Präzisionskontrollen im *LightCycler*

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der *Real Time* PCR (RT-PCR) innerhalb eines Laufes wurde für das Haushaltsgen HPRT1 und das schwach exprimierte Gen Keratin 8 (KRT8) eine RT-PCR mit zehn Replikaten an cDNA durchgeführt. Sowohl Pipettierfehler als auch eine niedrige Effizienz der PCR könnten zu hohen Standardabweichungen bei den CP Werten führen. Innerhalb der zehn Ansätze wichen die CP Werte für das stark exprimierte Gen HPRT1 um 0,34 voneinander ab, das *low copy* Gen KRT8 ergab eine höhere Standardabweichung von 1,72 (Tabelle 3.5). Dies verdeutlichte die hohe Präzision der RT-PCR für hochgradig exprimierte Gene wie HPRT1. Größere Unterschiede waren bei Genen mit CP

Werten über 46,00, wie bei KRT8, zwischen den einzelnen Proben zu erwarten und die Regel. Daraus folgt, dass Schwankungen in der Expression sehr niedrig exprimierter Gene eher auf Abweichungen des Systems zurückzuführen sind, als auf eine tatsächliche Regulation.

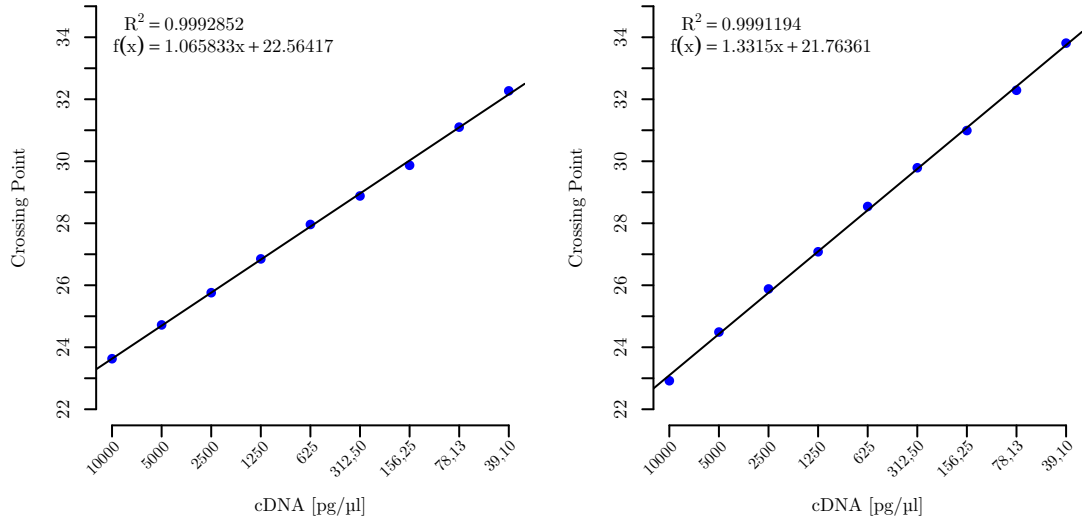
Die *Inter*-Präzision zwischen verschiedenen RT-PCR Läufen wurde dadurch sichergestellt, dass in jedem *LightCycler* Lauf neben den Zielgenen zwei Haushaltsgene mitgeführt wurden (siehe Kapitel 2.2.13.4). Da über die gesamte Genexpressionsstudie die Standardabweichung des Haushaltsgens HPRT1 geringer war als die von GAPDH, wurde die quantitative Auswertung der untersuchten Gene in Bezug auf HPRT1 durchgeführt (die CP Werte des HPRT1 Gens in jeder individuellen PCR befinden sich im Anhang in Kapitel A.4.1).

Tabelle 3.5: Eine der RNA Isolationen primärer bIPE Zellen kultiviert auf Plastik wurde verwendet, um zehn Ansätze cDNA herzustellen. Die cDNAs wurden in einer RT-PCR für das stark exprimierte Gen HPRT1 und das niedrig exprimierte Gen KRT8 eingesetzt. Aus den einzelnen CP Werten wurden Mittelwert und Standardabweichung für beide Gene berechnet.

	***Crossing Point* [CP]**	
cDNA	**HPRT1**	**KRT8**
1	23,94	46,16
2	23,73	50,79
3	23,29	51,54
4	23,72	50,48
5	23,47	51,83
6	23,55	50,63
7	23,44	48,72
8	23,11	49,88
9	22,81	48,28
10	23,75	48,89
Mittelwert	23,48	49,72
Standardabweichung	0,34	1,72

Tabelle 3.6: Eine cDNA Verdünnungsreihe der Gesamt-RNA von bIPE Zellen kultiviert auf Plastik wurde hergestellt und in einer RT-PCR für die Haushaltsgene HPRT1 und GAPDH eingesetzt. Erwartungsgemäß führte die abnehmende cDNA Konzentration zu steigenden CP Werten.

Konzentration [pg/µl]	***Crossing Point* [CP]**	
cDNA	**HPRT1**	**GAPDH**
10000	23,63	22,92
5000	24,72	24,49
2500	25,76	25,88
1250	26,85	27,08
625,00	27,96	28,54
312,50	28,88	29,79
156,25	29,87	30,99
78,13	31,10	32,29
39,10	32,27	33,81



(a) HPRT1 (b) GAPDH

Abbildung 3.26: Darstellung der CP Werte in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA Konzentration. Die cDNA Verdünnungsreihen für beide Haushaltsgene HPRT1 (a) und GAPDH (b) ergaben in der RT-PCR eine lineare Regressionsgerade der CP Werte. Die daraus resultierenden Korrelationskoeffizienten sind nahe 1,0 und bestätigen die hohe Effizienz der Polymerase Kettenreaktion sowie der verwendeten Polymerase.

Zur Überprüfung der Effizienz der RT-PCR wurde eine Verdünnungsreihe von einer der cDNA Proben hergestellt und in einer Polymerase Kettenreaktion für die Haushaltsgene HPRT1 und GAPDH eingesetzt (Tabelle 3.6). Aus der graphischen Darstellung der CP Werte beider Gene ging eine lineare Steigung der Regressionsgeraden hervor. Die Polymeraseaktivität war folglich in jeder Verdünnung gleich wirkungsvoll. Die aus der Gerade ermittelten Korrelationskoeffizienten lagen mit 0,9992852 für HPRT1 und 0,9991194 für GAPDH näherungsweise an 1,0 (Abbildung 3.26), wodurch eine eine fast 100%ige Effizienz der Genamplifikation bestätigt wurde.

3.6.3 *Crossing Points* und Datenanalyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR

Die Echtzeitverfolgung der RT-PCR ermöglicht die Beobachtung des Fluoreszenzanstieges mit zunehmender Zyklenzahl.

Die Auswertungs*software* gibt dies während der RT-PCR und in den Schmelkurvenanalysen graphisch wieder (Abbildung 3.27, A und B bzw. C-F). Die Kontrollen ohne cDNA, welche für jedes Gen mitgeführt wurden, zeigten entweder einen im Vergleich zu den Testgenen um mindestens acht höheren CP Wert an, oder waren mit einem CP größer als 56,00 nicht detektierbar. Dies wurde an Kurven sichtbar, die erst bei einer deutlich höheren Zyklenzahl als die der Testgene exponentiell anstiegen oder aber auf der Nulllinie verliefen (B). Schmelzkurvenanalysen bestätigten für die Haushaltsgene spezifische Scheitelpunkte in allen drei Ansätzen pro Zellart und Material. Anders als beim Haushaltsgen HPRT1 (D) waren beim Haushaltsgen GAPDH (C) die Scheitelpunkte häufig nicht genau auf der selben Höhe, was wiederum den Einsatz von HPRT1 als bevorzugtes Referenzgen für die quantitative Auswertung bestätigte.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden für alle Testgene 2 µl cDNA eingesetzt. Jedoch zeigte sich, dass die Gene für RPE65, CRALBP und VEGF die Expression in primären bRPE Zellen nicht detektierbar war und ein CP Wert mit $> 56,00$ angegeben wurde. Allerdings waren in den Schmelzkurven kleine oder beginnende Scheitelpunkte zu erkennen, was vermuten ließ, dass mit

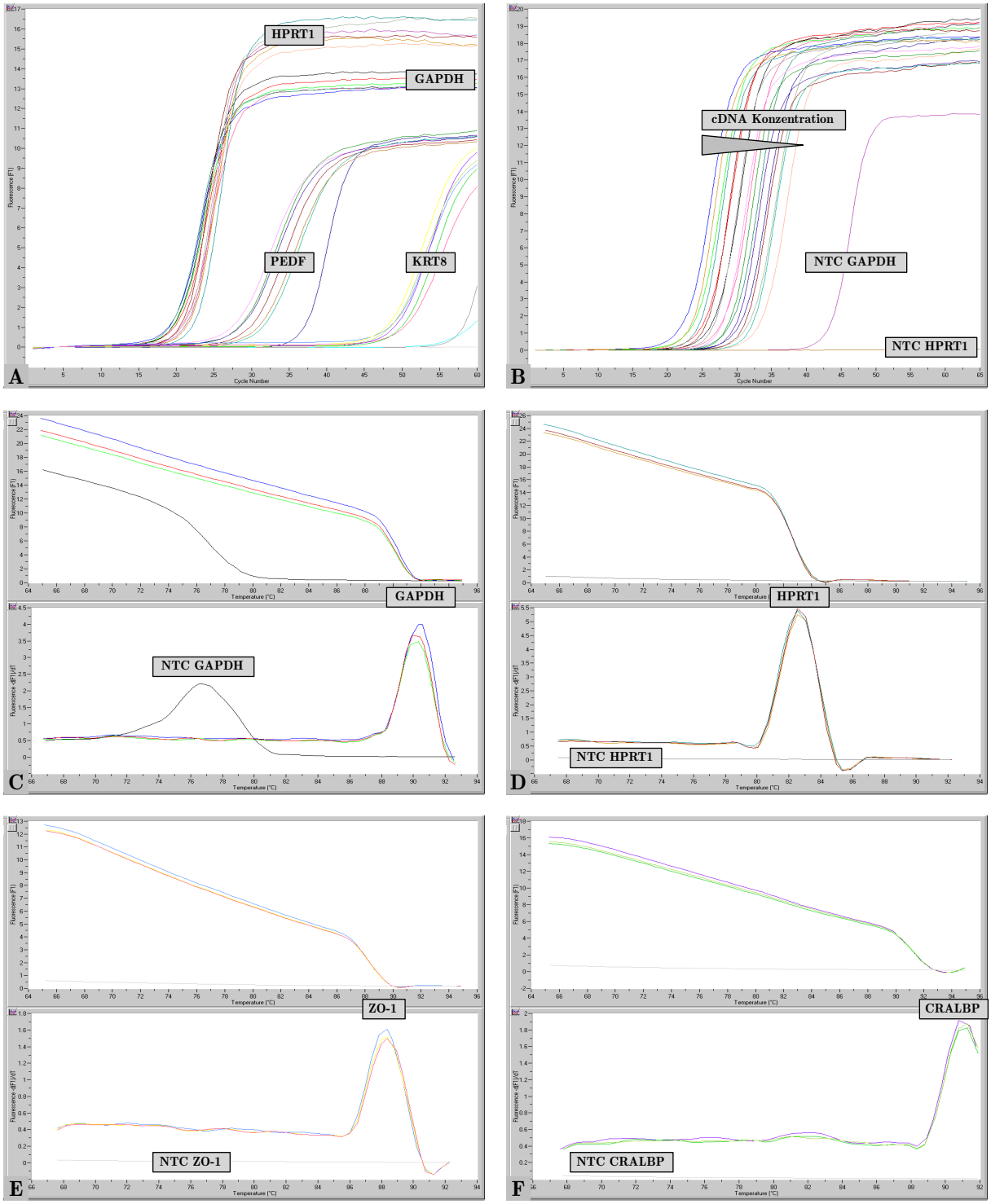


Abbildung 3.27: Bildschirmfoto der Datenausgabe der *LightCycler Software*. A und B zeigen die Darstellung der *Crossing Points*: (A) für die Zielgene PEDF und KRT8 sowie die beiden Haushaltsgene GAPDH und HPRT1 und (B) die cDNA Verdünnungsreihe für die beiden Haushaltsgene. C-F stellen beispielhaft die Schmelzkurvenanalysen der beiden Haushaltsgene GAPDH (C) und HPRT1 (D) sowie des stark exprimierten Gens ZO-1 (E) und des niedrig exprimierten Gens CRALBP dar (F).

Tabelle 3.7: Einteilung der Genexpression von bRPE und bIPE Zellen auf Plastik und den Biomaterialien in Kategorien. Anhand der CP Werte wird die Expression in *high copy* (CP von 20-30), *low copy* (CP von 31-45) und *absolute low copy* (CP > 46) unterschieden.

Zellart	**Material**	**Genkategorie**													
		high copy					***low copy***						***absolute low copy***		
		CathD	VEGF	PEDF	ZO-1	CD86	VEGF	PEDF	ZO-1	CD86	CRALBP	RPE65	CD86	RPE65	KRT8
bRPE	Plastik	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	Kollagen	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
	Amnion	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
	Seide	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	PLLA	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
bIPE	Plastik	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	Kollagen	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
	Amnion	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
	Seide	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
	PLLA	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+

einer erhöhten cDNA Konzentration im Reaktionsansatz der CP Wert dieser Gene detektierbar würde. Aus diesem Grund wurde die RT-PCR für die drei Gene RPE65, CRALBP und VEGF sowie für CD86 mit 3 µl cDNA durchgeführt. Jedoch konnten aufgrund der limitierten Menge an Gesamt-RNA nicht alle Testgene mit 3 µl cDNA untersucht werden. Auch bei primären bIPE Zellen konnten nicht alle Testgene mit 2 µl cDNA in der RT-PCR detektiert werden. Aus diesem Grund und zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gleichen Gene wie bei RPE mit 3 µl cDNA nachgewiesen.

Bei RPE Zellen auf PLLA waren in der ersten von drei Proben die Gene KRT8 und RPE65 und auf Amnion in einer Kultur das VEGF Gen nicht detektierbar. In IPE Zellen war ebenfalls KRT8 in zwei von drei Proben auf Kollagen und einer Probe auf Seide nicht detektierbar. VEGF konnte auf PLLA der dritten Kultur und Amnion der ersten Kultur aufgrund des limitierten Volumens an Gesamt-RNA in IPE Zellen nicht nachgewiesen werden.

Anhand der CP Werte ließ sich die Genexpression der RPE und IPE Zellen auf Plastik und Biomaterialien in Kategorien von *high copy* (CP von 20-30), *low copy* (CP von 31-45) und *absolute low copy* (CP > 46) einteilen (Tabelle 3.7).

Auf allen Materialien war KRT8 sowohl in RPE, als auch in IPE Zellen ein *absolute low copy* Gen. RPE65 fiel in RPE Zellen auf Amnion, Seide und PLLA, in IPE Zellen dagegen nur auf Amnion ebenfalls in diese Kategorie. Die größte Gruppe in dieser Genexpressionsstudie machten die *low copy* Gene aus. RPE und IPE exprimierten auf allen Materialien CRALBP nur gering und auch ZO-1 bzw. VEGF schlossen sich zelltypspezifisch dieser Kategorie an. PEDF tendierte auf Seide und Kollagen in IPE Zellen zu einem *high copy* Gen, wurde mehrheitlich von den Zellen jedoch in geringerem Maße transkribiert. Cathepsin D (CathD) war das einzige Gen, welches durchweg der Kategorie *high copy* zuzuordnen war. CD86 wurde sowohl in RPE

und IPE Zellen, als auch auf den Materialien sehr unterschiedlich exprimiert und ließ sich daher allen drei Kategorien zuordnen.

3.6.4 Quantifizierung der Genexpression von bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien

Die Quantifizierung der RT-PCR erfolgte nach der ΔΔCT Methode (siehe Kapitel 2.2.13.4). Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9 zeigen zusammenfassend die Mittelwerte aus den drei Kulturen für primäre bRPE bzw. bIPE Zellen. Die Standardabeichungen bei stark exprimierten Genen wie CathD oder PEDF waren kleiner als bei den schwächer exprimierten Genen, was den Präzisionskontrollen der RT-PCR entsprach (vgl. Kapitel 3.6.2).

Der geschätzte Fehler im ΔCP Wert blieb zum ΔΔCP Wert hin gleich, da sowohl für die Referenzkultur auf Plastik als auch für die Testkultur auf Biomaterial ein Fehler angegeben wurde. Somit entsprach die Subtraktion der gemittelten ΔCP Werte, um ΔΔCP zu erhalten, einer Subtraktion von einer beliebigen Konstante und bedurfte folglich keiner Neuberechnung einer Standardabweichung [Livak and Schmittgen, 2001]. Da in der verwendeten Berechnungsmethode die Standardkultivierung auf Plastik als Referenz behandelt wurde, auf die sich die Biomaterial-Kultivierung bezog, resultierte für Plastik der ΔΔCP Wert immer in Null und das Verhältnis $2^{-\Delta\Delta CP}$ $(= 2^0)$ immer in dem Wert eins. Folglich drückt sich die Hochregulation eines Zielgens auf dem Biomaterial relativ zur Referenz auf Plastik in Werten > 1 aus, wohingegen eine verminderte Expression ein Verhältnis < 1 ergibt.

Im Folgenden wurden aus den statistischen Daten der Verhältnisse $2^{-\Delta\Delta CP}$ Boxplots erstellt, um die Regulation der Gene auf den Biomaterialien im Vergleich zu den Kulturen auf Plastik graphisch zu verdeutlichen (Abbildung 3.28 und Abbildung 3.29). Da die statistischen Daten (Minimum, unteres Quartil, Median, oberes Quartil und Maximum) der Plastikreferenz stets Eins ergaben, wurden sie hier nicht dargestellt.

Die untersuchten Gene sollten verschiedene Aspekte von Zellen berücksichtigten (vgl. Kapitel 1.2.2). Daher wurden Gene ausgewählt, welche die charakteristische Physiologie der RPE Zellen beschreiben (RPE65, CRALBP, CathD), aber auch das Zytoskelett betreffen (KRT8 und ZO-1). Ein weiteres Auswahlkriterium war die für RPE Zellen typische Produktion von Wachstumsfaktoren (VEGF und PEDF) und ihre immunmodulatorische Eigenschaft (CD86).

RPE65 wurde in bovinen RPE Zellen auf allen Materialien im Vergeich zu Plastik herunter reguliert (Abbildung 3.28). Ausgehend vom Median war die geringste Regulation in Zellen auf Kollagen, gefolgt von Amnion, PLLA und Seide zu beobachten. CRALBP zeigte mit Ausnahme von Seide große Schwankungen in der Regulation innerhalb eines Materials, was sich in gestreckten *Boxplots* und weit auseinanderliegenden Minimal- und Maximalwerten ausdrückte. Da auf Kollagen, Amnion und PLLA je eine der drei Kulturen eine deutliche Hochregulation der Gene aufwies, lagen die oberen Quartile über Eins, jedoch wies der Median generell auf eine reduzierte Genexpression für CRALBP hin.

Als Marker für Entzündungsreaktionen sollte das Gen CD86 auf Biomaterialien bestenfalls herunter reguliert sein. Dies war für RPE aber nur in einer Kultur auf Amnion und PLLA der Fall. Auf PLLA Nanofasern zeigte sich im Median keine Regulation, wogegen auf Amnion eine etwa 20-fach erhöhte Genexpression von CD86 beobachtet wurde. Auf den Biomaterialien Kollagen und Seide war die CD86 Expression deutlich auf das ca. 3500-fache bzw. 61000-fache erhöht.

In situ verhalten sich die Wachstumsfaktoren VEGF und PEDF als Gegenspieler, so dass erwartungsgemäß PEDF einer Hochregulation von VEGF folgt. Dieses Expressionsmuter zeigte sich in geringem Ausmaß jedoch nur in Kulturen auf Kollagen. Auf Amnion und PLLA wurde

Tabelle 3.8: Mittelwerte der *Crossing Points* aus drei Kulturen boviner RPE Zellen auf Biomaterialien und der Plastikreferenz. Die CP, ΔCP und ΔΔCP Werte sind mit ihrer Standardabweichung aufgeführt. Das Verhältnis $2^{-\Delta\Delta CP}$ ist innerhalb eines asymmetrisch verteilten Bereiches angegeben. Die CP Werte der einzelnen PCR Läufe sind in Kapitel A.4.2 im Anhang erfasst.

Gen	Funktion	Material	CP	ΔCP	ΔΔCP	$2^{-\Delta\Delta CP}$		
RPE65	Retinol Recycling	Plastik	42,67 ± 3,05	20,71 ± 3,55	0,00 ± 3,55	0,09 <	1,00 <	11,68
		Kollagen	43,65 ± 1,56	22,14 ± 1,37	1,42 ± 1,37	0,14 <	0,37 <	0,96
		Amnion	47,06 ± 2,20	25,08 ± 2,45	4,37 ± 2,45	0,01 <	0,05 <	0,26
		Seide	47,90 ± 1,73	26,41 ± 1,83	5,69 ± 1,83	0,01 <	0,02 <	0,07
		PLLA	47,90 ± 1,66	21,60 ± 1,54	2,77 ± 1,54	0,05 <	0,15 <	0,43
CRALBP	Retinol Recycling	Plastik	41,05 ± 2,73	19,16 ± 3,06	0,00 ± 3,06	0,12 <	1,00 <	8,31
		Kollagen	41,14 ± 2,92	19,66 ± 3,42	0,50 ± 3,42	0,07 <	0,71 <	7,58
		Amnion	42,83 ± 2,96	20,75 ± 3,61	1,59 ± 3,61	0,03 <	0,33 <	4,06
		Seide	41,75 ± 0,99	20,08 ± 1,42	0,92 ± 1,42	0,20 <	0,53 <	1,41
		PLLA	43,01 ± 6,38	20,99 ± 6,44	1,83 ± 6,44	0,00 <	0,28 <	24,34
CathD	ROS Abbau	Plastik	20,08 ± 0,24	−2,73 ± 0,58	0,00 ± 0,58	0,67 <	1,00 <	1,49
		Kollagen	20,55 ± 0,65	−1,54 ± 1,36	1,19 ± 1,36	0,17 <	0,44 <	1,12
		Amnion	20,37 ± 0,07	−2,23 ± 0,32	0,78 ± 0,32	0,47 <	0,58 <	0,73
		Seide	19,67 ± 0,19	−2,24 ± 0,22	0,49 ± 0,22	0,61 <	0,71 <	0,82
		PLLA	21,91 ± 1,39	−0,63 ± 1,26	2,10 ± 1,26	0,10 <	0,23 <	0,56
KRT8	Intermediär-filament	Plastik	50,84 ± 1,94	28,04 ± 2,34	0,00 ± 2,34	0,20 <	1,00 <	5,06
		Kollagen	49,95 ± 0,69	27,86 ± 0,20	−0,18 ± 0,20	0,99 <	1,13 <	1,30
		Amnion	50,84 ± 2,17	28,24 ± 2,42	1,02 ± 2,42	0,09 <	0,49 <	2,64
		Seide	49,97 ± 1,12	28,06 ± 1,08	0,02 ± 1,08	0,46 <	0,98 <	2,09
		PLLA	50,31 ± 3,75	27,71 ± 3,63	0,49 ± 3,63	0,06 <	0,71 <	8,78
ZO-1	*Tight Junctions*	Plastik	43,12 ± 1,76	20,31 ± 2,32	0,00 ± 2,32	0,20 <	1,00 <	4,99
		Kollagen	40,59 ± 1,11	18,50 ± 1,01	−1,81 ± 1,01	1,74 <	3,51 <	7,07
		Amnion	40,41 ± 1,03	17,81 ± 1,28	−1,17 ± 1,28	0,93 <	2,26 <	5,47
		Seide	40,54 ± 0,09	18,63 ± 0,03	−1,68 ± 0,03	3,15 <	3,21 <	3,27
		PLLA	42,28 ± 0,59	19,74 ± 0,46	−0,58 ± 0,46	1,09 <	1,49 <	2,05
PEDF	Anti-angiogener Faktor	Plastik	32,41 ± 0,57	9,61 ± 0,94	0,00 ± 0,94	0,52 <	1,00 <	1,92
		Kollagen	31,48 ± 0,83	9,40 ± 1,05	−0,21 ± 1,05	0,56 <	1,16 <	2,39
		Amnion	34,47 ± 0,31	11,87 ± 0,56	2,76 ± 0,56	0,10 <	0,15 <	0,22
		Seide	29,22 ± 0,50	7,31 ± 0,43	−2,30 ± 0,43	3,65 <	4,92 <	6,65
		PLLA	39,32 ± 4,86	16,77 ± 4,73	7,17 ± 4,73	0,00 <	0,01 <	0,18
VEGF	Pro-angiogener Faktor	Plastik	33,66 ± 0,13	11,70 ± 0,58	0,00 ± 0,58	0,67 <	1,00 <	1,49
		Kollagen	31,55 ± 0,81	10,04 ± 0,89	−1,66 ± 0,89	1,70 <	3,15 <	5,83
		Amnion	30,64 ± 2,67	8,96 ± 1,74	−2,46 ± 1,74	1,65 <	5,51 <	18,45
		Seide	33,00 ± 1,83	11,50 ± 1,65	−0,20 ± 1,65	0,37 <	1,15 <	3,59
		PLLA	32,27 ± 0,49	10,25 ± 0,27	−1,45 ± 0,27	2,26 <	2,72 <	3,27
CD86	Immunantwort	Plastik	41,19 ± 2,57	19,30 ± 2,11	0,00 ± 2,11	0,23 <	1,00 <	4,30
		Kollagen	29,13 ± 2,61	7,65 ± 2,38	−11,65 ± 2,38	616,16 <	3213,66 <	16761,16
		Amnion	38,93 ± 2,60	16,84 ± 2,46	−2,46 ± 2,46	1,65 <	5,49 <	30,26
		Seide	26,01 ± 0,97	4,35 ± 1,40	−14,95 ± 1,40	31725,02 <	31725,02 <	83495,52
		PLLA	41,90 ± 0,71	19,88 ± 1,16	0,58 ± 1,16	0,30 <	0,67 <	1,49

Tabelle 3.9: Mittelwerte der *Crossing Points* aus drei Kulturen boviner IPE Zellen auf Biomaterialien und der Plastikreferenz. Die CP, ΔCP und ΔΔCP Werte sind mit ihrer Standardabweichung aufgeführt. Das Verhältnis $2^{-\Delta\Delta CP}$ ist innerhalb eines asymmetrisch verteilten Bereiches angegeben. Die CP Werte der einzelnen PCR Läufe sind in Kapitel A.4.2 im Anhang erfasst.

Gen	Funktion	Material	CP	ΔCP	ΔΔCP	$2^{-\Delta\Delta CP}$		
RPE65	Retinol Recycling	Plastik	45,77 ± 0,55	23,36 ± 1,05	0,00 ± 1,05	0,48 <	1,00 <	2,07
		Kollagen	45,74 ± 2,91	24,29 ± 2,62	0,93 ± 2,62	0,09 <	0,52 <	3,22
		Amnion	47,05 ± 1,46	24,37 ± 0,38	0,59 ± 0,38	0,51 <	0,66 <	0,86
		Seide	42,35 ± 0,99	20,39 ± 1,15	−2,96 ± 1,15	3,51 <	7,80 <	17,31
		PLLA	44,24 ± 1,04	21,46 ± 0,86	−1,90 ± 0,86	2,06 <	3,73 <	6,76
CRALBP	Retinol Recycling	Plastik	37,39 ± 1,67	14,74 ± 1,84	0,00 ± 1,84	0,28 <	1,00 <	3,57
		Kollagen	36,67 ± 0,62	15,02 ± 0,29	0,28 ± 0,29	0,67 <	0,82 <	1,00
		Amnion	37,02 ± 2,09	14,91 ± 1,89	−0,88 ± 1,89	0,50 <	1,84 <	6,83
		Seide	37,54 ± 1,04	15,55 ± 1,03	0,81 ± 1,03	0,28 <	0,57 <	1,17
		PLLA	39,97 ± 1,12	17,12 ± 0,69	2,38 ± 0,69	0,12 <	0,19 <	0,31
CathD	ROS Abbau	Plastik	20,58 ± 0,14	−2,63 ± 0,40	0,00 ± 0,40	0,76 <	1,00 <	1,32
		Kollagen	19,17 ± 0,66	−3,08 ± 0,86	−0,45 ± 0,86	0,75 <	1,36 <	2,47
		Amnion	20,73 ± 0,08	−2,54 ± 0,60	−0,13 ± 0,60	0,72 <	1,09 <	1,66
		Seide	20,46 ± 0,53	−2,14 ± 0,47	0,48 ± 0,47	0,52 <	0,72 <	0,99
		PLLA	22,37 ± 1,27	−1,21 ± 0,33	1,42 ± 0,33	0,30 <	0,37 <	0,47
KRT8	Intermediär-filament	Plastik	51,39 ± 0,50	28,18 ± 0,64	0,00 ± 0,64	0,64 <	1,00 <	1,56
		Kollagen	52,23 ± x	29,93 ± x	1,25 ± x	x <	0,42 <	x
		Amnion	47,70 ± 0,06	24,43 ± 0,45	−4,11 ± 0,45	12,67 <	17,31 <	23,65
		Seide	52,33 ± 1,73	29,62 ± 1,91	1,56 ± 1,91	0,09 <	0,34 <	1,28
		PLLA	50,23 ± 1,14	26,66 ± 0,54	−1,52 ± 0,54	1,97 <	2,87 <	4,18
ZO-1	*Tight Junctions*	Plastik	41,98 ± 0,51	18,78 ± 0,82	0,00 ± 0,82	0,57 <	1,00 <	1,77
		Kollagen	29,08 ± 0,15	6,83 ± 0,25	−11,94 ± 0,25	3320,49 <	3935,20 <	4663,71
		Amnion	40,70 ± 0,08	17,43 ± 0,33	−1,79 ± 0,33	2,76 <	3,47 <	4,36
		Seide	29,70 ± 0,30	7,10 ± 0,21	−11,68 ± 0,21	2841,35 <	3281,18 <	3789,10
		PLLA	43,12 ± 2,07	19,54 ± 1,16	0,77 ± 1,16	0,26 <	0,59 <	1,31
PEDF	Anti-angiogener Faktor	Plastik	44,14 ± 1,82	20,94 ± 1,77	0,00 ± 1,77	0,29 <	1,00 <	3,42
		Kollagen	30,61 ± 1,64	8,36 ± 1,30	−12,58 ± 1,30	2481,57 <	6104,07 <	15014,53
		Amnion	34,89 ± 1,15	11,62 ± 0,63	−8,66 ± 0,63	260,77 <	404,03 <	626,00
		Seide	27,66 ± 1,02	5,06 ± 1,13	−15,88 ± 1,13	27578,41 <	60166,24 <	131261,27
		PLLA	36,44 ± 0,51	12,86 ± 1,42	−8,07 ± 1,42	100,57 <	268,93 <	719,19
VEGF	Pro-angiogener Faktor	Plastik	34,76 ± 1,48	12,35 ± 0,96	0,00 ± 0,96	0,51 <	1,00 <	1,95
		Kollagen	31,47 ± 0,58	10,02 ± 0,44	−2,33 ± 0,44	3,70 <	5,03 <	6,83
		Amnion	33,21 ± 0,47	10,52 ± 0,60	−1,32 ± 0,60	1,64 <	2,49 <	3,78
		Seide	33,22 ± 0,32	11,26 ± 0,20	−1,08 ± 0,20	1,85 <	2,12 <	2,43
		PLLA	32,95 ± 1,53	10,84 ± 1,69	−1,57 ± 1,69	0,92 <	2,96 <	9,53
CD86	Immunantwort	Plastik	46,51 ± 1,85	23,86 ± 1,49	0,00 ± 1,49	0,36 <	1,00 <	2,81
		Kollagen	45,88 ± 0,85	24,22 ± 0,72	0,37 ± 0,72	0,47 <	0,77 <	1,27
		Amnion	48,41 ± 4,02	26,29 ± 3,82	3,11 ± 3,82	0,01 <	0,12 <	1,64
		Seide	30,98 ± 1,90	8,99 ± 2,01	−14,86 ± 2,01	7397,23 <	29794,90 <	120009,25
		PLLA	48,11 ± 3,78	25,26 ± 4,33	1,40 ± 4,33	0,02 <	0,38 <	7,59

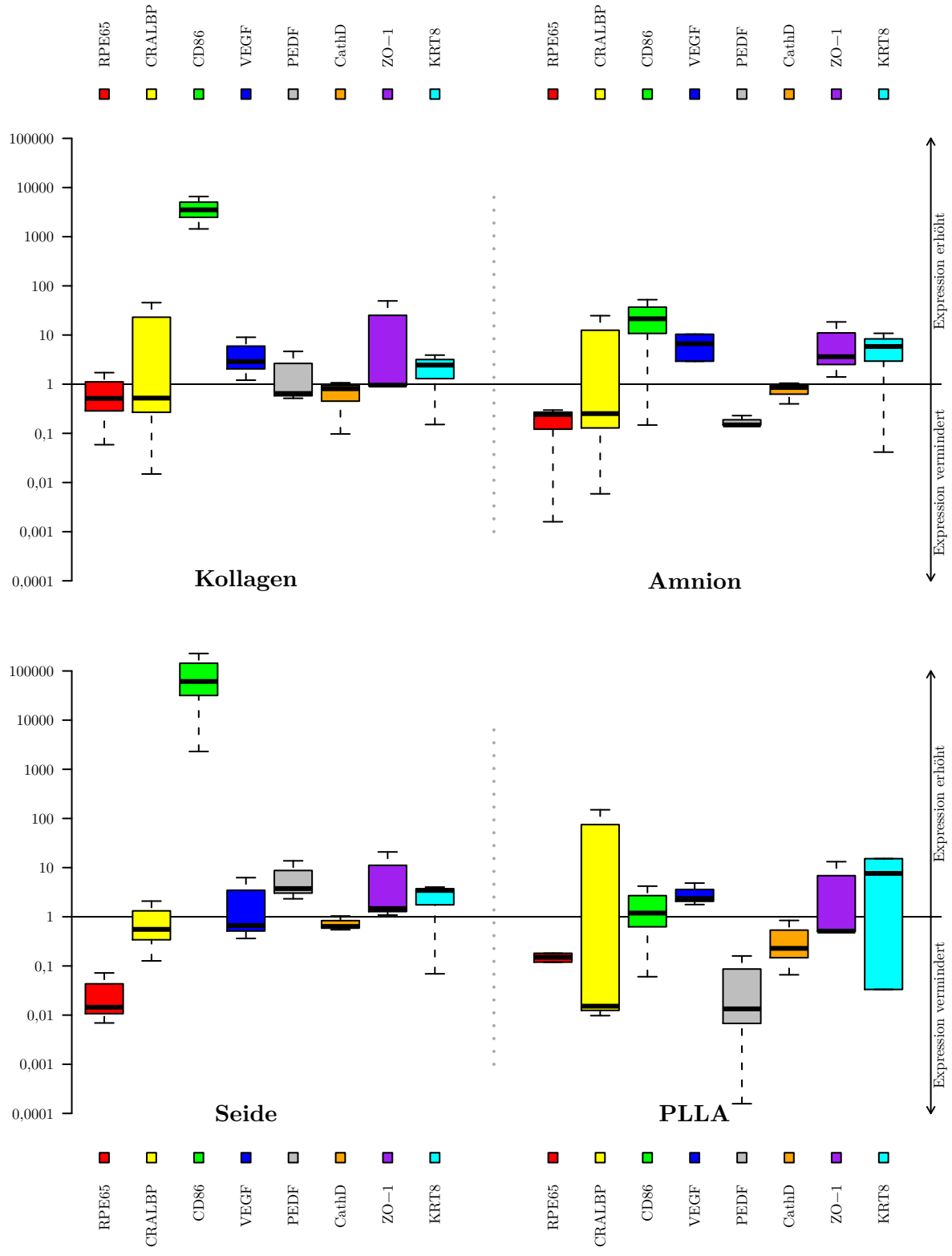


Abbildung 3.28: Genexpressionsanalyse von bovinen RPE Zellen nach 14 Tagen Kultur auf Biomaterialien. Die relative Expression ist auf Kulturen unter Standardbedingungen auf Plastik bezogen, die per Definition gleich Eins gesetzt ist.

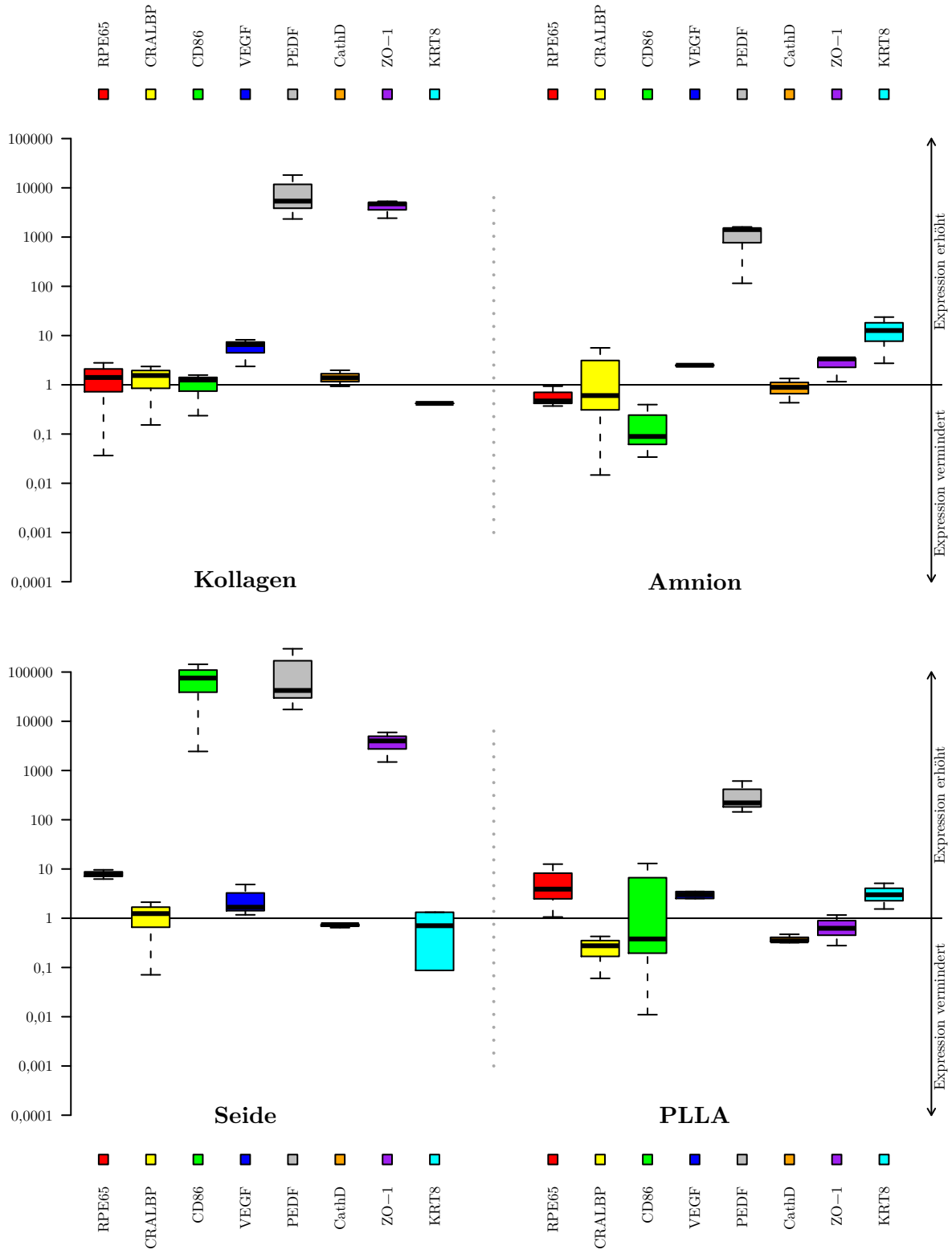


Abbildung 3.29: Genexpressionsanalyse von bovinen IPE Zellen nach 14 Tagen Kultur auf Biomaterialien. Die relative Expression ist auf Kulturen unter Standardbedingungen auf Plastik bezogen, die per Definition gleich Eins gesetzt ist.

in RPE Zellen das Gen für PEDF im Gegensatz zu VEGF reduziert exprimiert. Kulturen auf Seide wiesen ein umgekehrtes VEGF/PEDF Muster auf und erhöhten die PEDF Expression.

Von allen Genen zeigte das lysosomale Enzym CathD im RPE die geringste Regulation auf den Biomaterialien sowie die kleinsten Abweichungen innerhalb der drei Kulturen. Auf Amnion, Kollagen und Seide wurde die Genexpression nur geringfügig reduziert, lediglich auf PLLA sank die Expression auf etwa ein Viertel der Expressionsrate von Kontrollkulturen auf Plastik.

Die Gene ZO-1 und KRT8, welche das Zytoskelett betreffen, waren im Vergleich zu CathD wieder stärker und unterschiedlicher reguliert. Auf allen Materialien wurde die ZO-1 Expression in einer der drei Kulturen erhöht. In den anderen zwei Kulturen, die den Median stärker beeinflussten, reduzierten die Zellen auf PLLA die Expression, regulierten sie aber nicht auf Kollagen. Auf Seide und Amnion verstärkten sie die Expression leicht. Die Expression des KRT8 Gens wurde auf allen Materialien in zwei von drei Kulturen leicht erhöht.

In bovinen IPE Zellen wurde RPE65 auf Seide und PLLA hoch reguliert (Abbildung 3.29). Auf Kollagen war die Expression in zwei der drei Kulturen leicht erhöht, in der dritten jedoch reduziert. Auf Amnion wurde RPE65 in allen Kulturen herunter reguliert.

Durch die Kultivierung auf Kollagen regulierten die Zellen CRALBP in ähnlicher Weise wie RPE65. Seide ergab ein nahezu identisches Expressionsmuster für CRALBP wie Kollagen. Stark schwankend, aber von der Tendenz her reduziert, zeigte sich die CRALBP Expression auf Amnion. Eindeutig vermindert war die Expression dieses Gens in Zellen auf PLLA Fasern.

CD86 wurde sehr unterschiedlich von bIPE Zellen auf den Biomaterialien exprimiert. Auf Kollagen zeigte sich kaum eine Regulation im Vergleich zu Plastik, wogegen die Zellen auf Amnion die Expression reduzierten. In zwei von drei Kulturen wurde die Expression von CD86 auf PLLA vermindert, in der dritten Kultur jedoch verstärkt exprimiert. Wie schon in RPE Zellen zeigte sich auch für IPE Zellen eine deutlich erhöhte CD86 Expression auf Seide, welche im Median den höchsten Wert der gesamten Versuchsreihe erreichte.

Bei der Kultivierung der IPE Zellen wurde ein Gegensatz der PEDF versus VEGF Expression wie in RPE Zellen nicht beobachtet. Beide Gene wurden auf allen Materialien hoch reguliert und entsprachen damit dem natürlichen Expressionsmuster von RPE Zellen. Die VEGF Expression wurde auf allen Biomaterialien in ähnlicher Weise leicht erhöht. Dagegen zeigte PEDF auf allen Substraten eine deutliche Zunahme in der Genexpression mit dem kleinsten Faktor von 220 auf PLLA. Auf Seide lag die Expression annähernd auf gleicher Höhe mit CD86.

Für das ZO-1 Gen ergab sich meist eine verstärkte Expression. Auf Amnion war diese nur leicht im Vergleich zur Kontrollgruppe, auf Kollagen und Seide jedoch ausdrücklich. PLLA verminderte die ZO-1 Expression als einziges Material um etwa ein Drittel. Eine Reduktion der KRT8 Expression war für Zellen auf Kollagen nicht eindeutig, da nur eine Kultur ausgewertet werden konnte. Auf Amnion und PLLA wurde die Expression erhöht, auf Seide im Median leicht vermindert.

3.7 Subkonjunktivale Transplantation in das Kaninchenauge

3.7.1 Klinische Verlaufskontrollen

Im Rahmen der Nachsorge nach subkonjunktivaler Transplantation der Materialien wurden im Abstand von einer bis drei Wochen die Augen mittels OP-Mikroskop kontrolliert. Hierbei ergaben sich klinische Hinweise auf die Verträglichkeit der Materialien im Auge (Abbildung 3.30). Eine inflammatorische Reaktion machte sich durch Einsprossung neuer Gefäße und deren Morphologie vor allem nach wenigen postoperativen Tagen bemerkbar. Ein anderes deutliches Zeichen für eine Reaktion auf das Material war die Einkapselung bis hin zur prominenten Erhebung des Implantats. Eine sehr gute Biokompatibilität zeichnete sich durch eine plan liegende Folie und

keinerlei Gefäßbildung aus. Das Material war mit Ausnahme der Nanofasern aufgrund der DTAF Färbung deutlich sichtbar auf der weißen Sklera lokalisiert.

3.7.1.1 equine Kollagenmembran

Der klinische Verlauf der Tiere mit Kollagenimplantaten beinhaltete n=3 Augen im kurzen Verlauf bis zu einer Woche, n=10 Augen in der mittleren Nachbeobachtungszeit von 2-5 Wochen und n=6 Augen für die Zeit ab sechs Wochen bis hin zur Degradation des Materials.

Eine Woche nach Transplantation zeigten alle Tiere einen komplikationslosen Verlauf. Alle Implantationsareale waren reizfrei und absolut blande (A). Im mittleren Verlauf entwickelten sich in der Nachbeobachtung bis zu drei Wochen leichte Entzündungen bei drei Tieren. Diese fanden sich jeweils benachbart zu einem der Folienstücke an der Naht. Bei den folgenden Kontrollen waren diese Reaktionen rückläufig. Die Implantate selbst waren stets inert und nur selten von wenigen feinen Gefäßen überzogen (E und I). Bis zum völligen Abbau des Materials nach 16 Wochen wurden klinisch keinerlei inflammatorische Reaktionen beobachtet. Im mittleren Verlauf konnten bei drei Tieren schon nach drei Wochen deutliche Abbauzeichen beobachtet werden, denn makroskopisch waren die Folien nicht mehr als ganzes Stück und an der Implantationsstelle eine Reduktion der Gelbfärbung zu erkennen (E). Dies ist darauf zurückzuführen, dass in den Operationen für die Langzeitbeobachtung und die Kurzzeitverläufe eine andere Fertigungsauflage des equinen Kollagens eingesetzt wurde, als in einigen mittleren Verläufen.

3.7.1.2 humane Amnionmembran

Die Anzahl der Augen mit Amnionmembran nach subkonjunktivaler Transplantation betrug n=5 im Kurzzeitverlauf, n=6 im Zeitraum bis zu fünf Wochen und n=7 im Langzeitverlauf bis hin zum Materialabbau. Innerhalb der kurzen Nachbeobachtungszeit waren bei allen Tieren klinisch die Transplantationsareale um die DTAF gefärbte Folie reizfrei und blande (B). Bei einem Tier zeigte sich nach einer Woche um eine der beiden Folien eine leichte Kapsel, die durch eine Reaktion an der sehr nahe liegenden Naht verursacht wurde. Im mittleren Verlauf wiesen drei von sechs Tieren bis zu drei Wochen zum Teil milde Entzündungsreaktionen mit leichter Gefäßeinsprossungen auf (F). Diese erschien stets an nur einem der beiden Implantate, meist an dem temporal gelegenen. Im weiteren Verlauf von 4-5 Wochen war die entzündliche Antwort auf das Material rückläufig (J). Bis zum fast vollständigen Abbau nach 14 Wochen stellten sich die Gewebe um die transplantierten Folienstücke entweder von Beginn an oder ab etwa vier Wochen absolut reizfrei dar. Der Abbau des Materials ab der zwölften Woche wurde anhand des nur noch blass gelben DTAF Farbstoffs und der diffusen Membranstruktur deutlich (M und P).

3.7.1.3 Seidenmembran

Zur klinischen Beobachtung wurden im Kurzzeitverlauf in n=4 Augen Seidenmembranen implantiert. Für den mittleren Verlauf standen n=9 Augen und in der Langzeitbeobachtung n=5 Augen zur Verfügung. Um die Seidenmembranen bildeten sich im kurzen Verlauf an drei von vier Augen makroskopisch sichtbare Entzündungsreaktionen. Diese wurden in Form von Einkapselung des Materials und Einsprossung neuer Gefäße über der Seidemmembran beobachtet (C). Einzelne Gefäße wiesen eine verstärkte Gefäßfüllung und eine korkenzieherartige Morphologie auf. Das vierte Auge in der Kurzzeit-Gruppe zeichnete sich dagegen durch einen komplikationslosen Verlauf und reizfreie Implantate aus.

In der Nachbeobachtungszeit von 2-5 Wochen waren zwei Augen klinisch blande, bei allen anderen bewirkte zumindest ein Transplantat pro Auge eine zum Teil starke Entzündung (G). An zwei Augen wurde diese durch den Nahtfaden ausgelöst. In der Mehrheit der Augen waren um das Material deutliche Gefäßeinsprossungen und -dilatationen oder eine Einkapselung mit

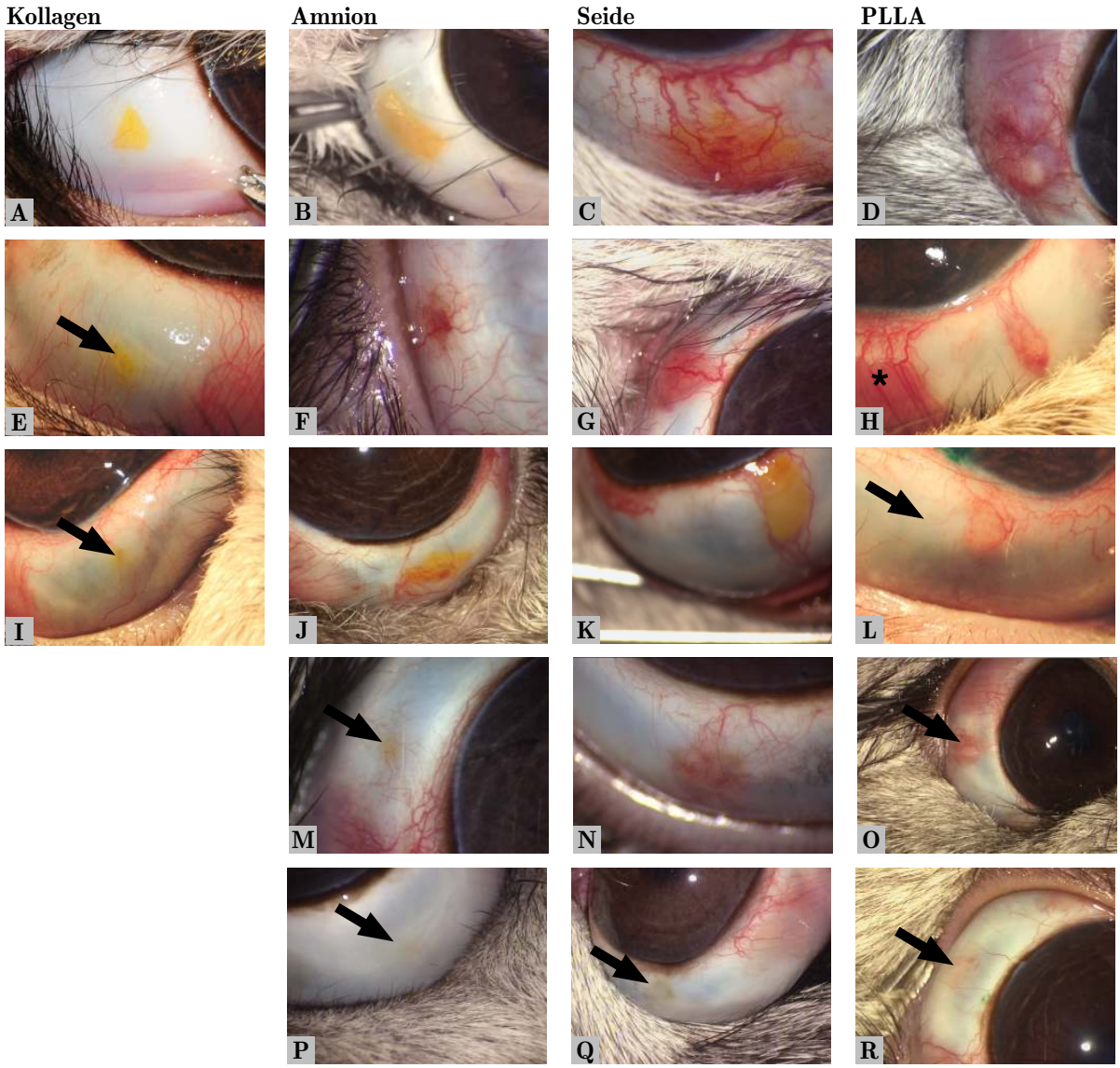


Abbildung 3.30: Klinische Kontrollen nach subkonjunktivaler Transplantation. Die Tiere wurden in Narkose mittels OP-Mikroskop auf Entzündungsreaktionen hin untersucht. A-D entspricht der Nachbeobachtungszeit von einer Woche, E-H von 3 Wochen und I-L von 5 Wochen. Amnion wies nach 12 Wochen (M) und 14 Wochen (P) Zeichen von Abbau auf, Seide nach 8 (N) und 13 Wochen (Q). PLLA wurde nach 12 (O) und 16 Wochen (R) kontrolliert. Der Stern in (H) markiert einen Augenmuskel und stellt folglich kein Zeichen für eine Entzündungsreaktion dar.

Erhebung des Transplantationsareals zu sehen. Gegen Ende der mittleren Beobachtungszeit ließen die Reaktionen im Vergleich zu früheren Zeitpunkten leicht nach (K). Wie schon bei Amnion wurde in dieser Zeit deutlich, dass die Entzündungsreaktionen an Implantaten an der temporalen Position ausgeprägter waren, als an der superioren 12 Uhr Position.

Im Langzeitverlauf verbesserte sich die Verträglichkeit dahingehend, dass die klinischen Entzündungszeichen rückläufig waren. Nach acht Wochen hatten sich die Gefäße meist in eine feine Vaskularisation gewandelt und die Einkapselung der Folien zeigte sich weniger erhaben (N). Ab der elften Woche konnten deutliche Zeichen für eine Degradation der Seidenmembranen beobachtet werden. Die Folienstücke waren klinisch nur noch durch Farbstoffreste, nicht aber

als definierte Membran zu erkennen (Q).

3.7.1.4 Poly-L-Lactid Vliese

Insgesamt 17 Augen wurden mit PLLA Implantaten versehen, davon n=5 für den Verlauf von einer Woche, n=6 für die Zeit bis zu fünf Wochen und n=6 zur Beobachtung bis zur Degradation der Faservliese. Da das Material zu hydrophob für eine Färbung mit DTAF war, wurde es nativ und trocken unter die Bindehaut transplantiert. Das Material ließ sich - falls gefaltet- in der feuchten Umgebung der subkonjunktivalen Tasche nicht glätten. Zur Lokalisation der Implantate wurden die Tiere mit grüner Farbe am Limbus auf dem gleichen Längengrad überhalb des Vlieses tätowiert. Im Transplantationsareal um PLLA Fasern entwickelte sich im Kurzzeitverlauf bei vier Augen eine deutliche Entzündungsreaktion, die sich in nur einem Fall mit einer Nahtreaktion assoziieren ließ. Die Entzündung ging bei drei Augen mit einer Kapselbildung einher, bei allen betroffenen Augen kam es zu Gefäßeinsprossungen (D). An einem Auge demonstrierten beide PLLA Implantate eine inerte und blande Situation.

Im mittleren Verlauf erwies sich die inflammatorische Reaktion klinisch als rückläufig. Schon nach drei Wochen war die Gefäßeinsprossung und Kapsel milder und gegen Ende der mittleren Nachbeobachtungszeit weiter reduziert (H). Reaktionen am Nahtfaden waren zum Teil deutlicher als am eigentlichen Implantat, welches direkt unterhalb der Tätowierung lokalisiert war (L, Pfeil). Der Abbau des Materials war aufgrund der fehlenden Färbung nicht eindeutig zu benennen. Eine erhabene Kapsel persistierte bis zu elf Wochen nach Transplantation, trotzdem wirkte das Implantat insgesamt reizarm (O). Nach 16 Wochen wurden die zum Teil blassen Transplantationsareale als deutliche Zeichen für eine Degradation gewertet und die Nachbeobachtung beendet.

3.7.1.5 Zusammenfassung der klinischen Beobachtungen

Ausgehend von den klinischen Kontrollen ließ sich feststellen, dass Kollagen und Amnion deutlich weniger Entzündungsreaktionen nach subkonjunktivaler Transplantation hervorriefen als Seidenmembranen und PLLA Vliese. Kollagen zeigte die beste Biokompatibilität, da zu keiner Zeit eine Inflammation beobachtet wurde. Amnionmembran wies bei einzelnen Augen leichte Abwehrreaktionen auf, die abhängig von der Lage des Implantats waren und sich innerhalb von fünf Wochen zurückbildeten. Seide und PLLA bewirkten prominente Entzündungsreaktionen, die sich für Seide erst im Langzeitverlauf abmilderten. Implantate aus PLLA schienen nach einer ersten Abwehrreaktion schneller vertragen, aber eingekapselt zu werden.

Die durch diese klinische Betrachtung erfassbaren Degradationszeiträume der Materialien waren für Amnion und Seide sehr ähnlich mit nahezu abgebauten Folien nach 14 bzw. 13 Wochen. Kollagen war nach 16 und 24 Wochen nicht mehr als Folie zu erkennen. PLLA Transplantate schienen nach 16 Wochen abgebaut, was aber ohne eine histologische Beurteilung nicht eindeutig war.

3.7.2 Histologische Evaluierung der Biokompatibilität von Biomaterialien nach subkonjunktivaler Transplantation

Wie in Kapitel 2.2.16 beschrieben, wurden verschiedene Kriterien für eine vergleichende Beurteilung der Biokompatibilität der Biomaterialien herangezogen. Zum einen wurden in direkter Umgebung um das Material vorhandene Entzündungszellen gezählt. Zum anderen wurden Parameter wie Einkapselung des Transplantats, Vaskularisation des Areals, Vorkommen von Blutungen oder Nekrosen und die Ausbildung eines Granulationsgewebes vermerkt. Die Degradation der Materialien stellte ein zusätzliches Charakteristikum in der Evaluation dar.

3.7.2.1 Entzündungszellen

In der Übersicht zeigte sich, dass um Kollagenimplantate zu jeder Nachbeobachtungszeit nur einzelne Entzündungszellen lokalisiert waren (Tabelle 3.10). Dabei stieg die Zellzahl vom kurzen zum mittleren Verlauf leicht an, im Langzeitverlauf waren jedoch praktisch keine Entzündungszellen nachweisbar. Um die Amnionmembranen wanderten im kurzen und mittleren Verlauf mehr inflammatorische Zellen ein als um Kollagen. Im mittleren Verlauf stieg die Gesamtzahl über den Wert der PLLA Nanofasern, reduzierte sich aber bis zur Degradation deutlich. Seide ergab im kurzen Verlauf eine höhere Zahl an eingewanderten Zellen als Amnion, aber eine deutlich niedrigere als PLLA. Die höchste Zahl an Entzündungszellen um PLLA deckte sich mit der starken Entzündungsreaktion, die klinisch in der ersten Woche nach Transplantation des Vlieses beobachtet wurde.

Tabelle 3.10: Quantifizierung der Anzahl an Entzündungszellen in direkter Umgebung des Implantats anhand hochauflösender Gesichtsfelder. Die Werte aus allen Schnitten eines Nachbeobachtungszeitraums sind gemittelt.

	Zellzahl		
Material	**Kurzzeit**	**mittlerer Verlauf**	**Langzeit**
Kollagen	8	12	1
Amnion	21	53	4
Seide	27	100	24
PLLA	67	23	47

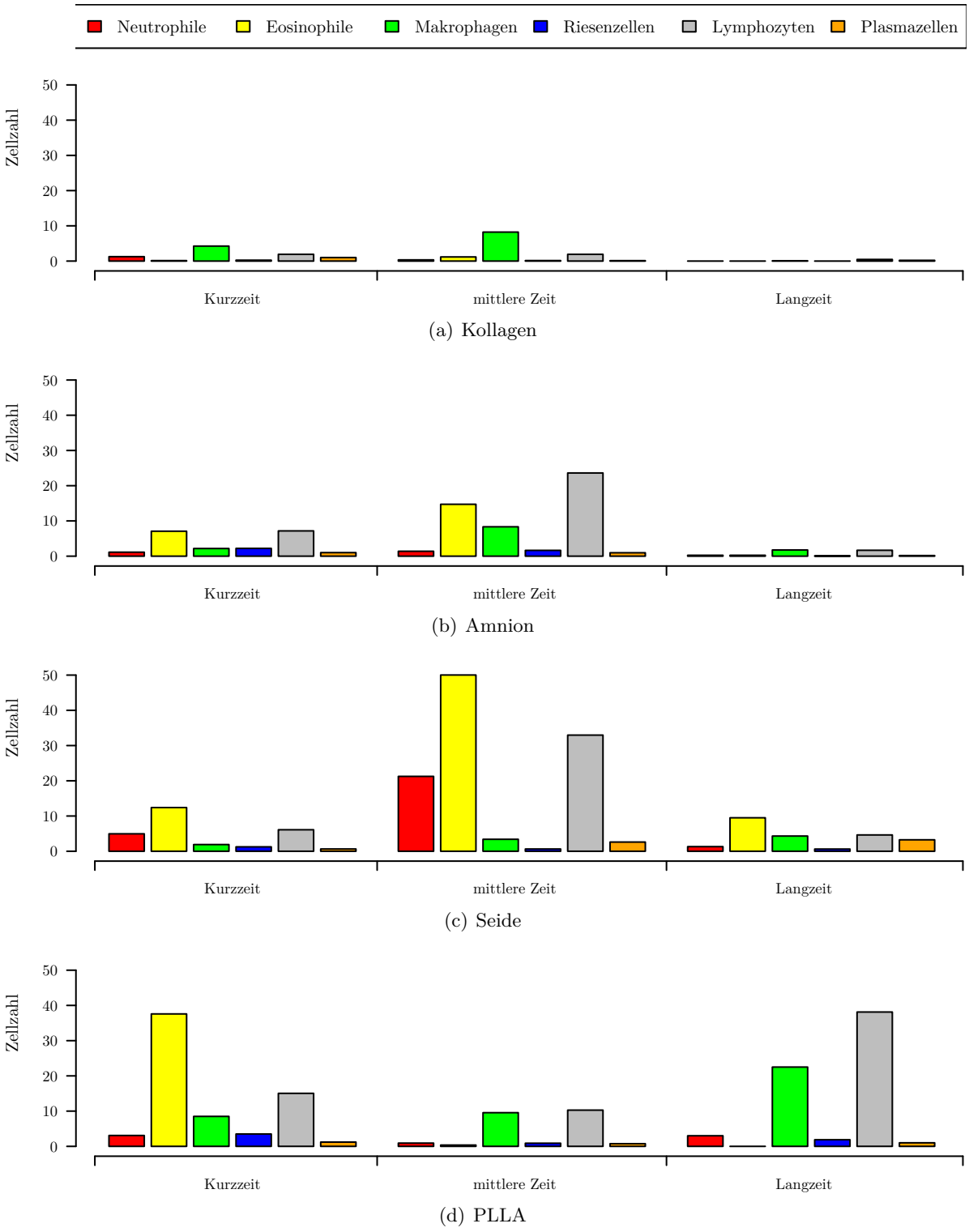
Im mittleren Verlauf unterschieden sich die Zellzahlen der Materialien dahingehend, dass sich die Anzahl um Seidenimplantate im Mittel noch deutlich auf etwa das Doppelte von Amnion erhöhte, um PLLA aber beträchtlich sank und eine geringere Reaktion als Amnion in diesem Zeitraum hervorrief. In der Nachbeobachtung bis zum Materialabbau wendete sich das Bild, denn um Seide war das Vorkommen von Entzündungszellen nur noch halb so groß wie das um PLLA Implantate. Im Vergleich zu den anderen drei Materialien zeigten PLLA Implantate einen atypischen Verlauf, denn die Gesamtzellzahl verringerte sich drastisch vom kurzen zum mittleren Nachsorgezeitraum, stieg aber bis zum Ende der Beobachtung nochmals an und erreichte hier die höchste Zellzahl.

In der Evaluation einzelner Zelltypen, die mit einer inflammatorischen- oder Fremdkörperreaktion assoziiert sind (siehe Kapitel 2.2.16), ergaben sich feinere Unterschiede zwischen den transplantierten Materialien (Abbildung 3.31).

Kollagen löste keine aktue Entzündungsreaktion aus, denn es wurde pro Gesichtsfeld maximal ein neutrophiler bzw. eosinophiler Granulozyt gezählt (Abbildung 3.32, A). Riesenzellen und Makrophagen als Hinweis auf eine Fremdkörperreaktion wurden ebenfalls in nur ganz geringem Maße und auch nur bis zum mittleren Kontrollzeitraum beobachtet (F).

Sie kamen einzeln in wenigen Gesichtsfeldern vor, Makrophagen waren im mittleren Verlauf mit acht Zellen die am häufigsten registrierten Zelltypen. Plasmazellen und Lymphozyten waren in manchen HE-Schnitten bis zum fünf Wochen Verlauf in einer Anzahl von ein oder maximal sechs Zellen vertreten (C). Im Langzeitverlauf zeigte sich in wenigen HE-Schnitten ein Lymphozyt. Dies verdeutlichte, dass die Areale um Kollagenimplantate auf zellulärer Ebene fast ausschließlich reizarm waren und keinerlei inflammatorische Reaktion im Gewebe herbeiführten.

Die vorherrschenden Zellen um Amnionmembranen waren Eosinophile und Lymphozyten (Abbildung 3.33, A, C). In der Zeit von einer bis fünf Wochen verdoppelte sich die Anzahl der Eosinophilen von sieben auf 15 Zellen im Mittel der Gesichtsfelder, die Lymphozytenzahl



(a) Kollagen

(b) Amnion

(c) Seide

(d) PLLA

Abbildung 3.31: Zellzahlen charakteristischer Entzündungszellen nach Auszählung von hochauflösenden Gesichtsfeldern um subkonjunktival transplantierte Kollagenfolien (a), Amnionmembranen (b), Seidenmembranen (c) und PLLA Faservliese (d). Die Zellzählungen jedes einzelnen Implantats sind in Kapitel A.5 im Anhang aufgelistet.

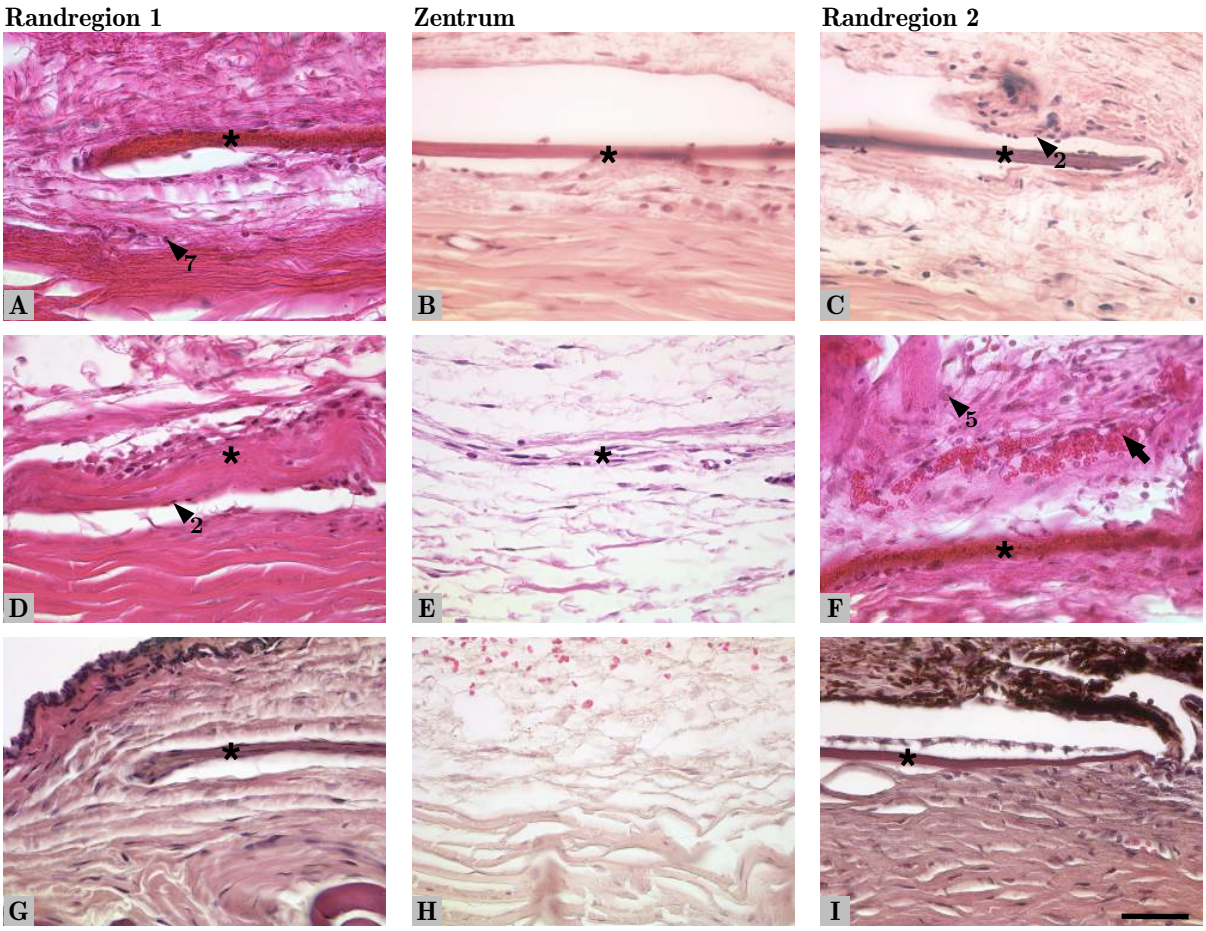


Abbildung 3.32: HE Färbung und hochauflösende Gesichtsfelder der Randregionen und des zentralen Bereiches von subkonjunktival transplantierten Kollagenfolien. A-C zeigt Implantate nach einer Woche, D-F im mittleren Verlauf von 2-5 Wochen und G-I während der Langzeitbeobachtung bis 16 Wochen. $*$ $\widehat{=}$ Kollagenfolie; Pfeil $\widehat{=}$ Blutgefäß; Pfeilspitze $\widehat{=}$ (2) Lymphozyt, (5) Makrophag, (7) neutrophiler Granulozyt. Maßstab $\widehat{=}$ 50 µm.

verdreifachte sich in dieser Zeit (E). Im Langzeitverlauf waren beide Zelltypen jedoch praktisch nicht mehr vorhanden. Selten wurden Makrophagen und Riesenzellen mit höchstens drei Zellen pro Gesichtsfeld im kurzen Verlauf beobachtet (B). In der mittleren Nachbeobachtungszeit steigerte sich die Makrophagenzahl leicht. Die Langzeitverfolgung bis zur Degradation der Membran zeigte, dass die Makrophagenzahl auf das Niveau der ersten Woche sank, Riesenzellen waren nicht mehr nachweisbar. Neutrophile Granulozyten und Plasmazellen waren zu jeder Zeit nur in Ausnahme im Transplantationsareal um Amnion zu finden. Schlussfolgernd induzierte das humane Amnion eine leichte akute Entzündung, die sich aber im späten Verlauf in eine reizarme Situation wandelte, in der das Material keine zelluläre Reaktion hervorrief.

Wie schon an der Gesamtzahl der Entzündungszellen deutlich wurde, lösten Seidenmembranen nach subkonjuntivaler Transplantation eine stärkere zelluläre Reaktion als Amnion aus. Vorherrschende Zelltypen im Verlauf der ersten Woche waren neben eosinophilen auch neutrophile Granulozyten und Lymphozyten (Abbildung 3.34, A-C). Im Vergleich dazu erwies sich die Fremdkörperreaktion als nicht auffällig, denn es wurden im Mittel nur eine Riesenzelle und zwei Makrophagen gezählt. Einzelne Plasmazellen konnten im kurzen Verlauf nur zweimal

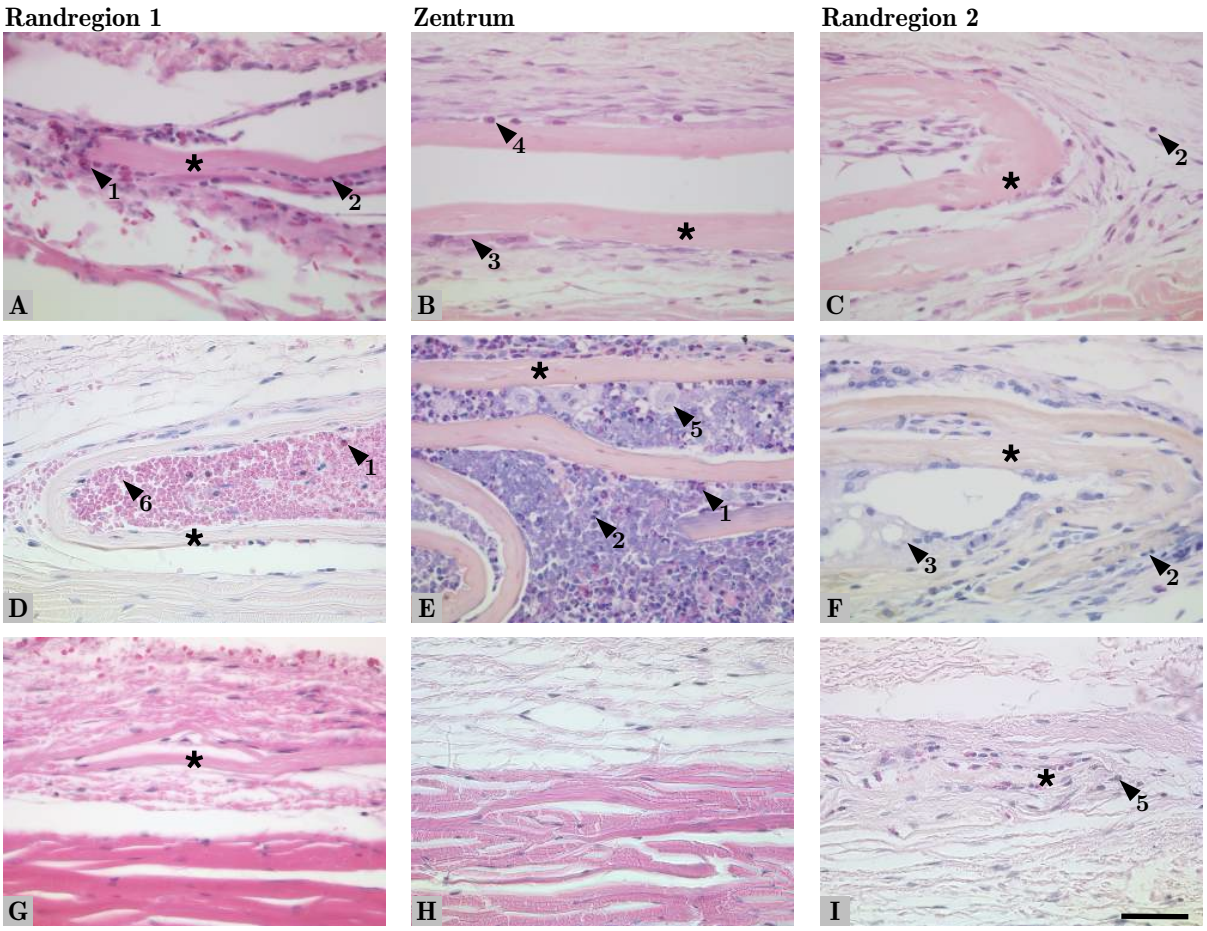


Abbildung 3.33: HE Färbung und hochauflösende Gesichtsfelder der Randregionen und des zentralen Bereiches von subkonjunktival transplantierten Amnionmembranen. A-C zeigt Implantate nach einer Woche, D-F im mittleren Verlauf von 2-5 Wochen und G-I während der Langzeitbeobachtung bis 14 Wochen. $*$ $\widehat{=}$ Amnionmembran; Pfeilspitzen $\widehat{=}$ (1) eosinophiler Granulozyt, (2) Lymphozyt, (3) Riesenzelle, (4) Plasmazelle, (5) Makrophag, (6) Erythrozyt. Maßstab $\widehat{=}$ 50 µm.

beobachtet werden, ihre Anzahl zeigte im mittleren- und Langzeitverlauf mit bis zu drei Zellen pro Gesichtsfeld auch weiterhin ein begrenztes Vorkommen.

Im mittleren Verlauf steigerte sich die Zahl der Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten deutlich im Vergleich zur ersten Woche (D-F). Bis zur Degradation der Seidenfolien sank die Zahl der Granulozyten und Lymphozyten zwar drastisch ab, lag jedoch weiterhin auf einem etwas höheren Niveau als bei Amnion. Dies gab Hinweise auf eine Manifestation der Entzündungsreaktion, obwohl im klinischen Verlauf die Anzeichen für eine Entzündung zurückgingen.

PLLA Nanofasern führten zu der prominentesten akuten Entzündung im Bereich des Transplantats, was sich durch die höchste Anzahl an eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in der ersten Woche ausdrückte (Abbildung 3.35, A, C). Einige Makrophagen waren in der ersten Woche um die PLLA Implantate vertreten, was auf eine moderate Fremdkörperreaktion hindeutete. Ihre Anzahl blieb im mittleren Verlauf konstant, war jedoch in der Langzeitbeobachtung mehr als doppelt so hoch (G, H). Riesenzellen waren je nach Schnitt von null bis zu zehn Zellen vertreten, im Mittel der Gesichtsfelder und im Vergleich zu den anderen Materialien vom kurzen bis zum Langzeitverlauf jedoch nicht signifikant erhöht.

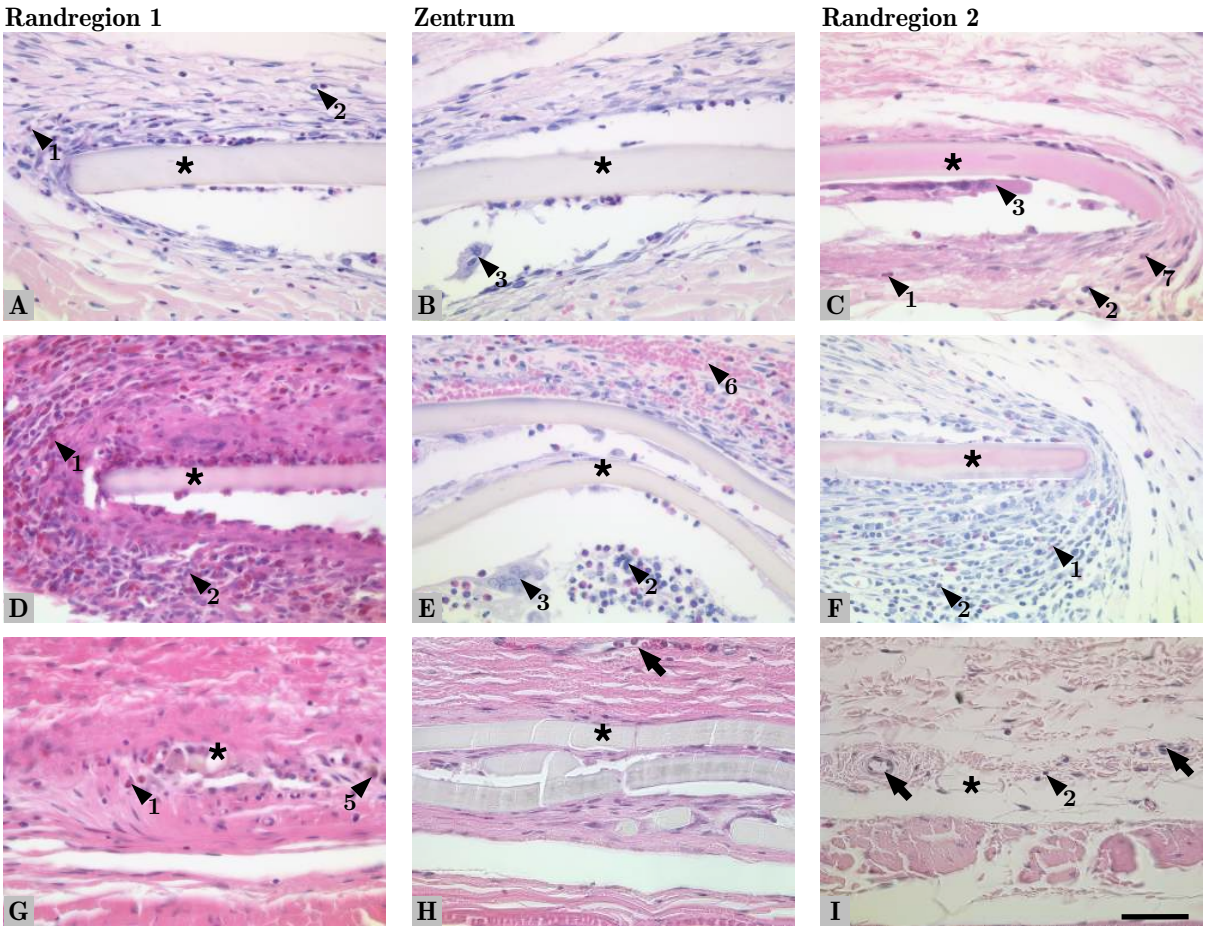


Abbildung 3.34: HE Färbung und hochauflösende Gesichtsfelder der Randregionen und des zentralen Bereiches von subkonjunktival transplantierten Seidenmembranen. A-C zeigt Implantate nach einer Woche, D-F im mittleren Verlauf von 2-5 Wochen und G-I während der Langzeitbeobachtung bis 13 Wochen. $*$ $\widehat{=}$ Seidenmembran; Pfeil $\widehat{=}$ Blutgefäß; Pfeilspitzen $\widehat{=}$ (1) eosinophiler Granulozyt, (2) Lymphozyt, (3) Riesenzelle, (5) Makrophag, (6) Erythrozyt, (7) neutrophiler Granulozyt. Maßstab $\widehat{=}$ 50 µm.

Die PLLA Nanofasern waren das einzige Material, bei dem sich die Anzahl aller Entzündungszellen von der ersten Woche bis zum mittleren Verlauf reduzierte; im Falle der Eosinophilen so sehr, dass diese hier und auch bis zur Degradation nicht mehr nachweisbar waren. Die Lymphozytenzahl zeigte sich im mittleren Verlauf geringer als auf Amnion und Seide. Bis zum Ende der Beobachtung stieg ihre Anzahl wie schon bei Makrophagen beschrieben jedoch um annähernd das Vierfache an. Dies waren Anzeichen für die Entwicklung einer chronischen granulomatösen Entzündung.

3.7.2.2 Degradation der Materialien

Zu Beginn der Studie waren alle Materialien in der HE Färbung gut lokalisierbar. Mit fortschreitendem Abbau waren die Folien mittels HE teilweise schwer zu detektieren. Hierbei half die DTAF Färbung, die zu einer gelb-grünen Fluoreszenz im nativen Paraffinschnitt führte und so auch Restbestandteile der Kollagen-, Amnion- und Seidenmembranen zu visualisieren vermochte

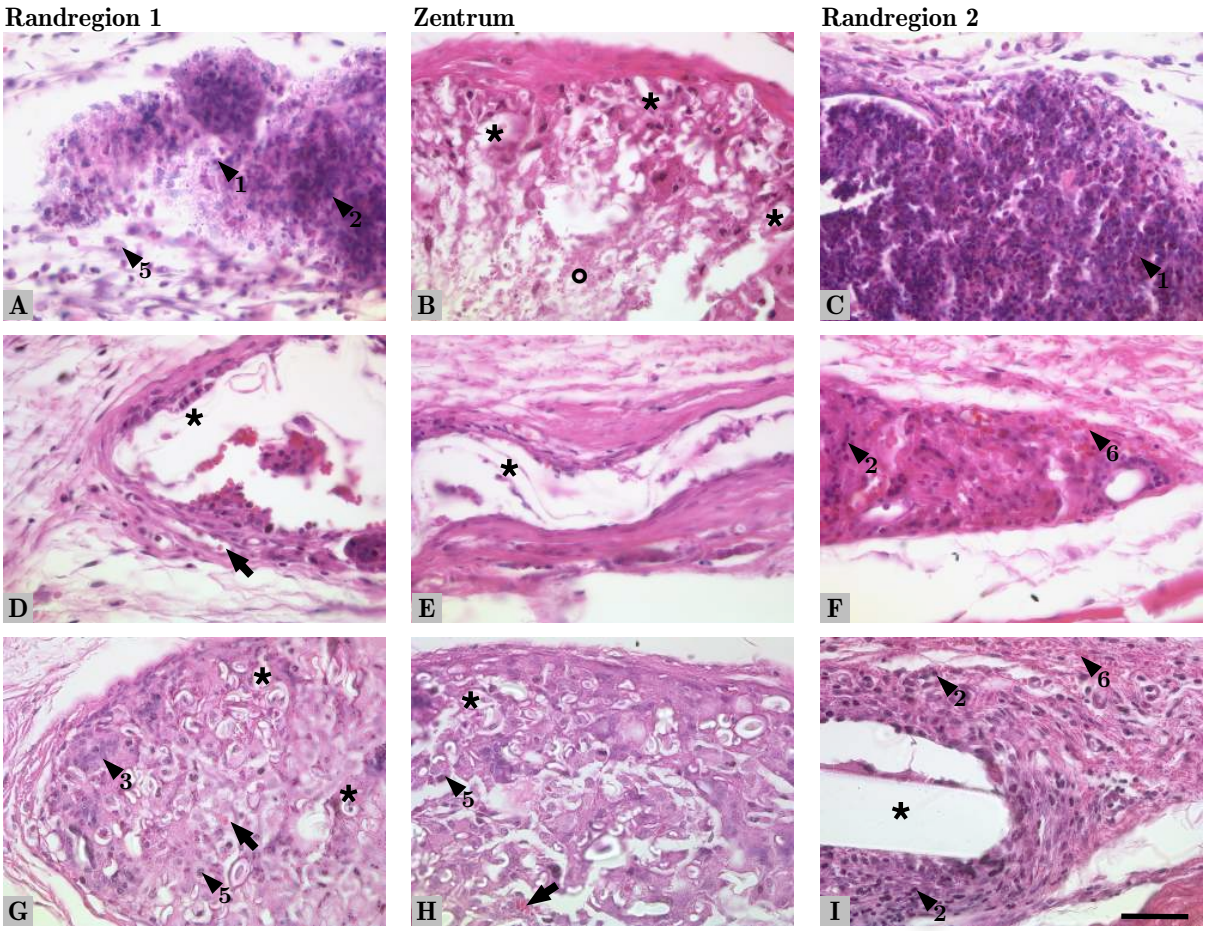


Abbildung 3.35: HE Färbung und hochauflösende Gesichtsfelder der Randregionen und des zentralen Bereiches von subkonjunktival transplantierten PLLA Faservliesen. A-C zeigt Implantate nach einer Woche, D-F im mittleren Verlauf von 2-5 Wochen und G-I während der Langzeitbeobachtung bis 16 Wochen. $*$ ≙ PLLA Fasern; Pfeil ≙ Blutgefäß; $\circ$ ≙ Nekrose; Pfeilspitzen ≙ (1) eosinophiler Granulozyt, (2) Lymphozyt, (3) Riesenzelle, (5) Makrophag, (6) Erythrozyt. Maßstab ≙ 50 µm.

(vgl. Abbildung 3.36). PLLA Fasern konnten mit diesem Farbstoff nicht gefärbt werden, so dass von diesem Material keine Fluoreszenzbilder vorlagen.

Die Degradation von Kollagenfolien nach subkonjunktivaler Transplantation verhielt sich sehr unterschiedlich. Zu Beginn dieser Dissertation wurde eine Fertigungsauflage verwendet, die sich bis zum Langzeitverlauf von 10 Wochen deutlich nachweisen ließ (vgl. Abbildung 3.32, G-I). Nach 16 und 24 Wochen waren in einem von insgesamt vier bzw. sechs Implantationsarealen nur noch Restbestandteile der Folie zu finden, so dass das Material innerhalb von 16 Wochen als abgebaut betrachtet werden konnte. Zu dieser Zeit zeigte sich in der Fluoreszenz nur ein leichter gelber Schimmer des DTAF Farbstoffs (Abbildung 3.36, J). Im Laufe der *in vivo* Studie wurden auch andere (neuere) Fertigungsauflagen von Kollagenmembranen implantiert, die in einer viel früheren Degradation resultierten. Schon nach drei Wochen waren die Folien stark aufgelockert (Abbildung 3.32, D) und von vielen Zellen infiltriert. Bei einem anderen Tier konnte im mittleren Verlauf die Folie nur aufgrund von wenigen einzelnen fibrillären Strukturen lokalisiert werden (E). Der Abbau war nach fünf Wochen komplettiert und das Material in der HE Färbung nicht

mehr detektierbar. Die ermittelten Materialdicken beziehen sich daher im kurzen und langen Verlauf auf die urspünglich verwendete Fertigungsauflage. Im mittleren Verlauf nahm die Dicke aufgrund der beschriebenen Auflockerung deutlich zu (Tabelle 3.11).

Während der Nachbeobachtungszeit von Amnien stieg die durchschnittliche Dicke der Membranen leicht an. Eine lockere Struktur dieses natürlichen Spendermaterials zeigte sich bereits im Kurzzeitverlauf nach subkonjunktivaler Transplantation (vgl. Abbildung 3.33, A-C). Die Mehrheit der Implantate des mittleren Verlaufs lag mehrfach gefaltet unter der Bindehaut und einige Randregionen waren aufgesplittert. Dadurch hatten Zellen die Möglichkeit, in und zwischen die

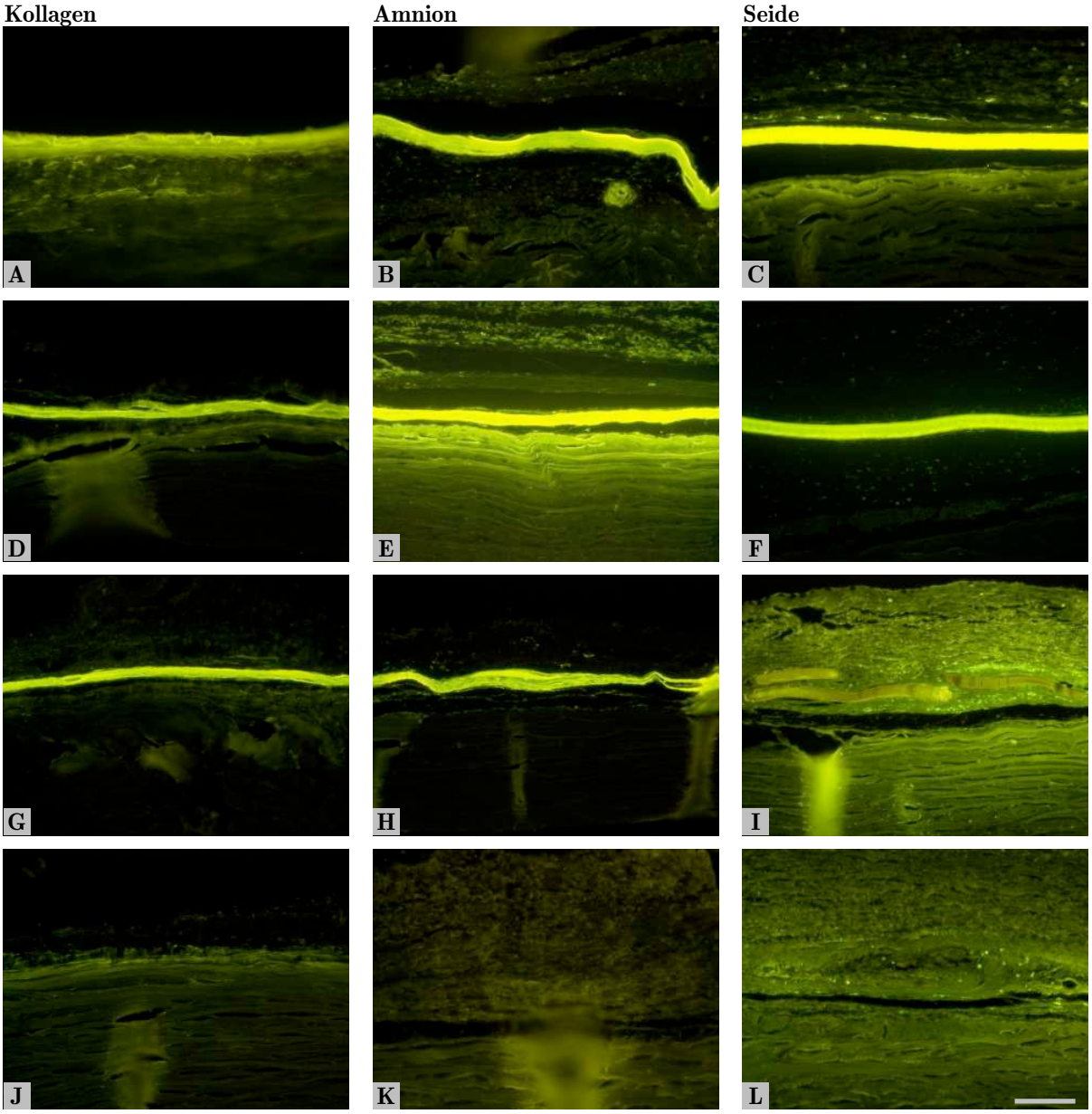


Abbildung 3.36: Fluoreszenzmikroskopie nativer Paraffinschnitte subkonjunktival transplantierter Kollagen-, Amnion- und Seidenmembranen. A-C zeigt exemplarisch Implantate nach einer Woche, D-F im mittleren Verlauf und G-L aus der Langzeitbeobachtung bis zum völligen Abbau der Materialien. Maßstab $\widehat{=}$ 100 µm.

Membran einzuwandern, was sich in einer geringen Zunahme der Materialdicke widerspiegelte (F). Mit fortschreitender Nachbeobachtung nach zwölf Wochen wurde das Material in den Implantationsregionen weiterhin lokalisiert. Die Membran zeigte jedoch Anzeichen von Degradation und war deutlich dünner als im mittleren Verlauf (G). Nach 13 Wochen wurden zwei von vier Transplantaten gefunden und stark aufgelockerte und deutlich abgebaute Überreste des Amnions in der HE Färbung sichtbar (I). Die beiden anderen Implantate waren zu der Zeit vollständig degradiert. Zum finalen Zeitpunkt nach 14 Wochen waren drei von vier Areale absolut blande und ohne Anzeichen eines Implantats oder Zelleinwanderung (H). Lediglich an einer Position wurden Reste von Amnionmembran beobachtet. In der Betrachtung der nativen Paraffinschnitte waren bis zur 12. Woche die Membranen aufgrund der intensiven DTAF Färbung noch eindeutig identifizierbar (Abbildung 3.36, B, E und H). Die völlige Degradation nach 14 Wochen ließ unter dem Fluoreszenzmikroskop nur Farbstoffwolken erkennen, die sich nicht mehr von der Hintergrundfluoreszenz abhoben (K).

Seide zeigte innerhalb des Materials zu keiner Zeit Verdickungen und in nur einem einzigen Schnitt eine Aufgabelung des Endes. Folglich ergab die Messung stets gleiche Werte für die minimale bzw. maximale Dicke (vgl. Tabelle 3.11). Dies war unabhängig davon, ob die Membran glatt oder gefaltet implantiert worden war. Im Gegensatz zu Kollagen und Amnion schien sich Seide nicht aufzulockern, sondern wirkte stets starr und kompakt. Selbst wenn sie in Teilstücke fragmentiert war, was ab dem mittleren Verlauf häufig auftrat, wirkten die Enden wie glatte Bruchkanten, die keine Angriffspunkte für eine Zellinfiltration boten (Abbildung 3.34). Im Kurzzeitverlauf erwies sich die Seide als deutlich dicker im Vergleich zur Messung des trockenen Materials (vgl. Kapitel 3.1.1).

Ab dem mittleren Verlauf nahm die Dicke auf 18 µm ab und verblieb - wenn sie detektiert wurde - in dieser Größe (I). Nach elf Wochen wurde in drei von vier Implantationsarealen jedoch keine Folie mehr detektiert. Die einzige noch vorhandene Seidenmembran war in viele Teilstücke zerlegt (vgl. Abbildung 3.34, H). Ähnlich zeigte sich die Situation nach 13 Wochen, denn auch hier konnte in nur einem von vier Fällen das Transplantat lokalisiert werden. Zu dieser Zeit war jedoch die Folie als solche so stark abgebaut, dass nur das Implantationsareal durch Zellen und wahrscheinliche Restbestandteile an Seide auszumachen war (Abbildung 3.34, G). Besonders zur Lokalisation der fast vollständig abgebauten Seidenmembranen war der DTAF Farbstoff nützlich. Nach 11 und 13 Wochen konnten noch diffuse DTAF Farbwolken im nativen Paraffinschnitt entdeckt werden (Abbildung 3.36, I und L). Diese zeigten Teilstücke oder die ursprüngliche Lage der Folie an, waren aber selbst nur noch wenig kontrastreich im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz. Somit ließ sich für Seidenmembranen auf einen kompletten Abbau des Materials nach 13 Wochen rückschließen.

Bei PLLA Fasern unterschied sich das Abbauverhalten abhängig davon, ob ein Stück aus der lockeren Vliesmitte transplantiert wurde, oder ein Teil des dichten Randes, der bei Liefer-

Tabelle 3.11: Im Rahmen der Evaluation wurde die minimale und maximale Dicke der Implantate bestimmt. Die Tabelle zeigt die Werte gemittelt aus allen Schnitten eines Nachbeobachtungszeitraums.

	Dicke [µm]		
Material	**Kurzzeit**	**mittlerer Verlauf**	**Langzeit**
Kollagen	15-19	19-35	12
Amnion	13-18	15-23	22-36
Seide	32	18	18-19
PLLA	208-235	120-125	44

ung auf dem Aluminiumring auflag (vgl. Kapitel 2.1.1). Da die Struktur des Materials keiner planen Folie, sondern einer willkürlichen Anordnung in einem Fasernetzwerk entsprach, erlaubte sie den Zellen von Anfang an, in das PLLA einzuwandern und es aufzulockern (Abbildung 3.35, A-C). Folglich konnte keine exakte Dicke des Materials bestimmt werden, sondern der vertikale Durchmesser des Implantatbereichs. Dieser verkleinerte sich vom kurzen Nachbeobachtungszeitraum bis zum mittleren Verlauf deutlich und analog zur klinisch rückläufigen Entzündungsreaktion (Tabelle 3.11). Im Fall der starren Randstücke war eine Messung der reinen Materialdicke möglich. Im Verlauf schien sich dieser Teil des PLLAs kaum abzubauen, denn auch nach elf Wochen war es noch zu lokalisieren (I). Zellen wanderten in das starre Rand-Material nicht ein, sondern lagerten sich außerhalb an (D, E). Im Langzeitverlauf wurde der Transplantationsbereich im Vergleich zum mittleren Verlauf deutlich kleiner. Bis zu 16 Wochen war ein Gewirke von Zellen und Teilen der PLLA Fasern zu erkennen. Diese wurden im Phasenkontrast als weiß leuchtende Strukturen im Gewebe deutlich. Im Rahmen dieser Dissertation konnte der Zeitpunkt der vollständigen Degradation des Materials nicht festgestellt werden. Trotzdem ließ sich zusammenfassen, dass ein Großteil des Materials im Zeitraum von 16 Wochen bis auf Restfragmente und Debris abgebaut wurde.

Im Vergleich der vier Materialien verlief die Degradation von Kollagenfolien in der Konjunktiva im Zeitrahmen von 10 bis maximal 16 Wochen ähnlich zu Seide und Amnion, denn die Membranen waren nach 13 bzw. 14 Wochen nicht mehr detektierbar. PLLA Faservliese benötigten mehr Zeit zum Materialabbau, da sie nach 16 Wochen noch Material erkennen ließen.

3.7.2.3 Ersatzgewebebildung und Gewebestruktur im Transplantationsareal

Im Allgemeinen ist eine charakteristische Reaktion auf einen Fremdkörper im Gewebe dessen Einkapselung und Abgrenzung zur Umgebung. Dies zeigt sich histologisch in einer Anordnung von parallelen Kollagenfasern um das Material. Zwischen den Materialien zeigten auftretende Kapseln unterschiedliche Ausprägungen und zeitliche Vorkommen. Eine stark ausgeprägte Kapsel, wie sie in den Kriterien als (+++) eingestuft wurde (vgl. Kapitel 2.2.16), trat jedoch bei keinem Material auf. Um Kollagenfolien bildete sich nur im mittleren Verlauf in einem Viertel der Schnitte und im Langzeitverlauf in einem von fünf Implantaten eine leichte Kapsel, die sich nur an einer Seite der Folie entwickelte und deshalb mit einem (+) bewertet wurde (Abbildung 3.37, A). Im Vergleich dazu reagierte das Gewebe um Amnion häufiger mit einer Einkapselung. Sowohl im kurzen als auch mittleren Verlauf kam es in zwei Drittel der Fälle zur Anlagerung von Kollagenfasern (B). Im mittleren Verlauf war eine stärkere Kapsel der Kategorie (++) vertreten, die sich auf beiden Seiten entlang der Membran erstreckte. Im Langzeitverlauf waren Kapselbildungen seltener, denn bei einem Drittel war nur eine milde Kapsel (+) nachweisbar.

Seide zeigte in der ersten Woche in fast allen Implantaten eine milde (C) und einmal eine fortgeschrittene Kapsel um die Membran. Im mittleren Verlauf war diese Reaktion vollständig rückläufig, es traten aber im Langzeitverlauf in der Hälfte der Schnitte wieder leichte Kapseln auf (K). Anzeichen einer Kapselbildung waren bei PLLA Vliesen bis zum mittleren Verlauf sehr ähnlich zu Amnion und auch hier wurde einmal eine fortgeschrittene Kapsel auf beiden Seiten des Materials beobachtet (D). Diese war eindeutig dem festen Randstück des Faservlies zuzuordnen. Langfristig wurden alle PLLA Implantate unabhängig von der Struktur von einer Kapsel umgeben. In der Hälfte der Fälle wurden diese mit (++) bewertet, da sie auf beiden Seiten des Materials zu finden waren.

Die Bildung von Granulationsgewebe beschreibt eine vitale Reaktion auf lokale Schädigungen, wie sie auch durch die Transplantation von Biomaterialien unter die Bindehaut entstehen. Dies umfasst zunächst die Einwanderung von Makrophagen in das betroffene Gebiet, wodurch die Resorptionsleistung des Gewebes gesteigert wird.

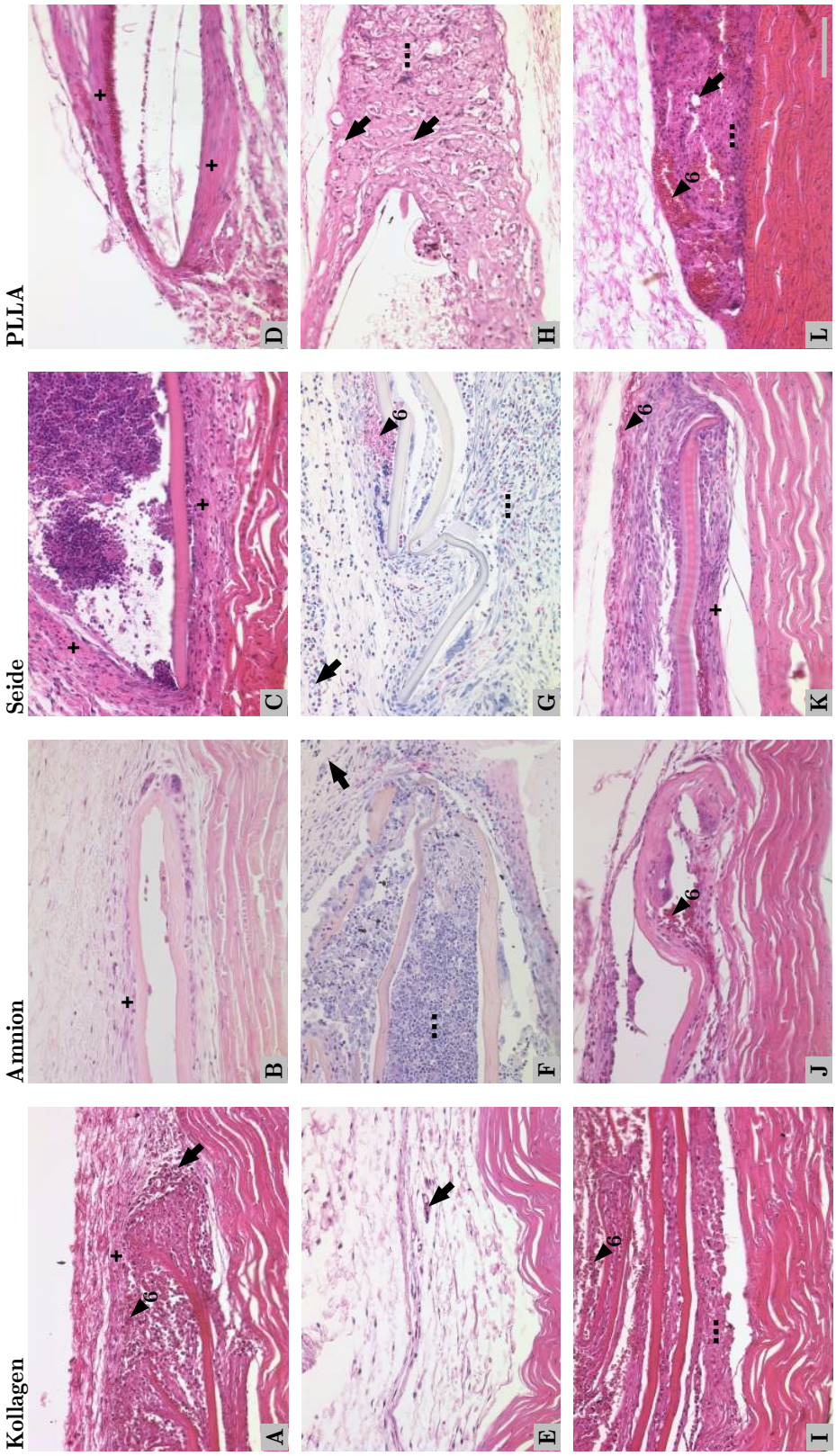


Abbildung 3.37: Ersatzgewebebildung um subkonjunktival transplantierte Biomaterialien. Die Abbildungen sind nicht nach Zeitraum sortiert, sondern stellen charakteristische Kriterien der Evaluation beispielhaft dar. (+) ≙ Kapsel, Pfeil ≙ Vaskularisation, (...) ≙ Granulationsgewebe und Pfeilspitze (6) ≙ Erythrozytenextravasat. Maßstab ≙ 100 µm.

Des Weiteren sprossen neue Gefäße in die Region ein und zu Myofibroblasten umgewandelte Fibroblasten verstärken die Synthese von Kollagen und extrazellulärer Matrix. Die Bildung einer Kapsel und von Granulationsgewebe kann parallel vonstatten gehen und ist kein strikt getrennter Prozess.

Nekrosen, die ebenfalls Ursache für die Bildung von Granulationsgewebe sein können, wurden im Rahmen dieser Evaluation nur selten beobachtet. Um Kollagenimplantate waren sie nicht zu finden und um Amnion und Seide nur in einem Schnitt des mittleren Verlaufs. Bei PLLA traten nekrotische Stellen in einem Schnitt des kurzen Verlaufs auf (Abbildung 3.35, B). In der Langzeitbeobachtung kamen generell keine pathologischen Gewebeveränderungen vor.

Granulationsgewebe wurde in der Umgebung um Kollagen nur wenig im frühen bzw. mittleren Verlauf sichtbar. Dieses zeigte sich vornehmlich um Folien der neueren Fertigungsauflagen (Abbildung 3.37, I). Amnion und PLLA bildeten zunächst in ähnlicher Weise ein Ersatzgewebe aus, welches in der Hälfte bis zwei Drittel der Schnitte im kurzen Verlauf und zu einem Drittel im mittleren Verlauf bestätigt wurde (F, L). Bis zur Degradation war an Amnionmembranen kein Granulationsgewebe nachweisbar, bei PLLA wurde es im Gegensatz dazu durchweg in allen Implantaten gebildet (H). In allen Beobachtungszeiträumen konnte um Seide häufig die Bildung von Granulationsgewebe beobachtet werden (G). Nach einer Woche fand sich dies in vier von fünf, im mittleren Verlauf bei allen und im Langzeitverlauf bei der Hälfte der Schnitte. In den übrigen Arealen der Langzeit-Gruppe hatte sich das Gewebe weiter zu Bindegewebe umgewandelt.

Da die Bildung neuer Gefäße nicht generell mit dem Vorhandensein von Granulationsgewebe korrespondierte, wurde die Neovaskularisierung um die Implantate als eigener Parameter untersucht. Um Kollagenimplantate der neuen Fertigungsauflage wurden Gefäße detektiert (A, E). Sie traten in der Hälfte der Schnitte im mittleren Verlauf auf, wurden im frühen oder langen Verlauf jedoch nicht beobachtet. Amnion und Seide wiesen Ähnlichkeiten in der Vaskularisierung auf, denn im Kurzzeitverlauf traten bei einem Drittel der Implantate Gefäße auf. Im mittleren Verlauf stieg die Häufigkeit der Vaskularisierung bei beiden Materialien ähnlich auf zwei Drittel der Implantate an (F und G). Erst im Langzeitverlauf wies Amnion im Unterschied zu Seide bei einem Drittel, Seide dagegen bei drei Viertel der Schnitte Gefäße auf. PLLA zeigte am häufigsten eine Bildung neuer Gefäße. Im Gegensatz zu allen anderen Materialien traten diese schon im Verlauf bis zu einer Woche bei fünf von sechs Implantaten auf. Diese Häufigkeit hielt auch im mittleren Verlauf weiter an und ging im Langzeitverlauf mit der Bildung von Granulationsgewebe einher (H, L).

In der Histologie wurden Erythrozyten nicht nur in neu gebildeten Gefäßen beobachtet, sondern auch als frei im Gewebe liegende Zellanhäufungen bzw. Extravasate. Dies ließ sich zum Teil auf Blutungen zurückführen, welche während der Implantation verursacht wurden. Generell kamen bei allen Materialien Blutungen vor. Kollagen zeigte nur im mittleren Verlauf in der Hälfte der Schnitte freiliegende Erythrozyten, und war damit das Material mit den seltensten Vorkommnissen einer Blutung (A und I). Um Amnionimplantate traten bei der Hälfte bzw. einem Drittel der Schnitte im kurzen bzw. mittleren Verlauf Hämorrhagien auf (J). Seide wurde wie Amnion nach einer Woche in einem Drittel der Schnitte von Blutungen begleitet, im mittleren Verlauf kamen sie mit fünf von sieben Fällen häufiger vor (G, K). In der Langzeitbeobachtung wurden sie um Amnion nicht beobachtet, bei Seide wurden jedoch zum ersten Mal Hämorrhagien im Langzeitverlauf in drei Viertel der untersuchten Schnitte festgestellt.

Implantate aus PLLA Faservliesen waren ebenfalls häufig mit Blutungen assoziiert. In fünf von sechs Schnitten des frühen Verlaufs und sechs von neun Transplantationsarealen der mittleren Beobachtungszeit traten Blutungen auf (L). Im Langzeitverlauf war das Vorkommen rückläufig, denn nur noch in der Hälfte der Schnitte kam es zu Blutungen.

Als Nebenbefund war auffällig, dass gefaltete Folien im Gegensatz zu plan liegenden Transplantaten deutlich stärkere Zellinflitrate erkennen ließen (Abbildung 3.37, A, F und G). Zudem

kam es häufiger zu Brüchen oder Aufsplitterungen als bei glatten Folien. Innerhalb der Faltungen entstanden Freiräume, in die die Zellen einwanderten.

3.7.2.4 Zusammenfassung der Bioverträglichkeit

Stellt man eine Rangliste der Materialverträglicheit nach subkonjunktivaler Transplantation auf, so war equines Kollagen aufgrund der geringsten zellulären Reaktion das Material mit der besten Biokompatibilität. Humane Amnionmembran wurde an zweiter Position nach einer leichten Entzündungsphase ohne Fremdkörperreaktion ebenfalls gut vom umliegenden Gewebe vertragen. Die Materialien aus Seide und Poly-L-Lactid ähnelten sich bezüglich der Ersatzgewebereaktion, zeigten aber auch Faktoren wie Nekrosen, Blutungen und Einkapselung, die für eine weniger gute Verträglichkeit sprechen. Dadurch, dass sich um PLLA die Zusammensetzung der Zellen typisch für eine chronische Entzündung im Langzeitverlauf verstärkt nachweisen ließen, sind die Nanofasern insgesamt am wenigsten verträglich.

3.8 Subretinale Transplantation von Kollagen- und Amnionmembranen

Die beiden Materialien Kollagen und Amnion wurden aufgrund ihrer guten Bioverträglichkeit zur Evaluierung der subretinalen Implantation ausgewählt. Im Gegensatz zu Seide und PLLA Vliesen zeigten beide Membranen eine sehr gute Handhabung und das beste Zellwachstum in Kultur. Des Weiteren bewies die subkonjunktivale Transplantation, dass die Materialien ohne Schwierigkeiten transplantiert werden konnten und sich glatt positionieren ließen.

Diese Studie untersuchte, ob eine exakte Plazierung der Biomaterialien im subretinalen Spalt zwischen Netzhaut und RPE möglich ist. Anhand der Histologie konnten Auswirkungen der Materialien auf die Netzhautstrukturen und die Toleranz im subretinalen Raum beurteilt werden. Die Langzeitnachbeobachtung sollte den Degradationszeitraums der Biomaterialien ermitteln.

Während des operativen Eingriffes ließen sich Kollagenmembranen der ursprünglichen Fertigungsauflagen sehr gut zuschneiden, mit einer Pinzette halten und ohne Komplikationen transplantieren [Thumann *et al.*, 2009]. Aufgrund ihrer Autostabilität entfaltete sich die Kollagenmembran sobald sie von der Pinzette gelöst wurde und ließ sich subretinal positionieren. Mit den Fertigungsauflagen, die nach zwei Wochen in Medium leicht quollen (vgl. Kapitel 3.1.4), verhielt sich das Kollagen während der subretinalen Implantation anders. Das Folienstück ließ sich schwerer manipulieren und löste sich nicht sofort von der Mikropinzette, wodurch die Positionierung erschwert wurde. Daher verliefen zwei von sieben Operationen traumatisch, so dass es zur Einblutung und Netzhautablösung (Amotio) kam. Bei zwei weiteren Tieren entwickelte sich eine Amotio während der ersten beiden postoperativen Wochen. War die Implantation erfolgreich, wurde in den klinischen Kontrollen des Augenhintergrundes (Fundus) während der Nachbeobachtung die glatte Lage der Kollagenmembran im subretialen Raum beibehalten (Abbildung 3.38, A). Die Retina lag oberhalb des Biomaterials an und zeigte eine normale Morphologie. Ödeme, Blasenbildung oder eine Nekrose der Retina wurden klinisch zu keiner Zeit beobachtet.

Amnionmembranen ließen sich stets gut handhaben und ohne Komplikationen implantieren. In den Kontrollen lagen alle Implantate flach und ausgebreitet unter der anliegenden Retina (C). Wie bei Kollagen traten weder Ödeme, Nekrosen oder morphologische Veränderungen der Retina auf. Zudem wurden durch den Transplantationsvorgang keine Blutungen ausgelöst. Bei einem von sechs Tieren entwickelte sich postoperativ eine Amotio über dem Transplantationsareal.

Selten wurde während des operativen Eingriffs die Linse berührt, so dass sich diese in der ersten Woche der Nachbeobachtung trübte und keinen Einblick auf den Fundus ermöglichte.

Die Makroskopie nach Enukleation und Fixierung der Augen verdeutlichte, dass unterhalb

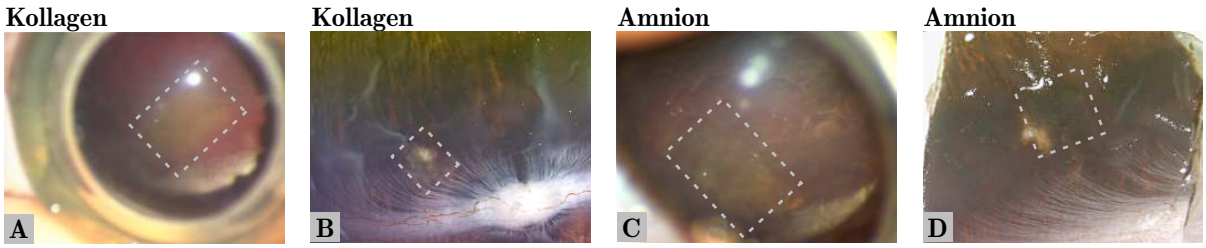


Abbildung 3.38: Klinische Kontrolle des Fundus nach subretinaler Transplantation von Kollagen bzw. Amnion (A, C) und Makroskopie der Implantationsareale nach Enukleation der Augen (B, D).

der Implantate das retinale Pigmentepithel lokal atrophiert war, was sich durch eine Depigmentierung des Epithels in einem kleinen Areal ausdrückte (Abbildung 3.38, B, D).

In der Histologie wurde die plane Lage unterhalb der Netzhaut für beide Biomaterialien nach Transplantation deutlich. Nach drei Wochen war eine normale Morphologie und Schichtung der Netzhaut zu erkennen, bei der die äußeren Segmente der Photorezeptoren teilweise erhalten waren (Abbildung 3.39 A, C). Der Spalt zwischen Retina und Membran ist auf die Formalinfixierung zurückzuführen. Nach fünf Wochen ließen sich sowohl Kollagen- als auch Amnionmembranen als flaches Material subretinal lokalisieren (E-H). Zu dieser Zeit war die äußere nukleäre Schicht der Netzhaut partiell degeneriert, unregelmäßig und in manchen Bereichen aufgehoben. Peripher vom Implantat zeigten alle Netzhäute stets eine natürliche Morphologie. Auch die Choroidea stellte sich zu jeder Zeit durch Vorkommen an Blutgefäßen und Melanozyten unbeeinträchtigt dar. Im Langzeitverlauf löste sich die lamellare Struktur der Retina über Kollagenfolien weiter auf und betraf nach zwölf Wochen auch die innere nukleäre Schicht (I). Die Anzahl der Zellkerne in der Ganglienzellschicht wirkte ebenfalls reduziert. Das Kollagen lag weiterhin als Membran vor, konnte mittels DTAF Färbung klar zugeordnet werden und zeigte keine Anzeichen von Degradation (J).

Nach 38 Wochen war in der HE Färbung die Kollagenfolie nicht mehr eindeutig lokalisierbar. In der Fluoreszenz wies die DTAF Färbung noch Restfragmente und aufgelockerte Strukturen der Membran nach (N), die mit der inneren nukleären und plexiformen Schicht der Netzhaut verwachsen schienen (M).

Amnionmembranen degradierten funduskopisch schneller und belegten in der Histologie nach 20 Wochen deutliche Abbaumerkmale (K, L). In der Fluoreszenzaufnahme wurde deutlich, dass die Membran ursprünglich erheblich länger war. Folgte man der DTAF Färbung weiter zum rechten Bildrand, so leuchteten noch einzelne Fragmente der Membran auf. Wie auch bei Kollagen wies die Netzhaut eine Degeneration im Bereich der äußeren und inneren nukleären Schichten auf. Die verminderte Zahl an Zellkernen ließ die Retina deutlich dünner erscheinen als nach drei und fünf Wochen. Obwohl ein weiterer Abbau des Amnions erwartet wurde, konnte nach 27 Wochen die Membran sowohl in der HE Färbung als auch mittels Fluoreszenz eindeutig nachgewiesen werden (O, P). Da die äußere nukleäre Schicht fehlte, lag die Membran direkt an der ausgedünnten inneren nukleären Schicht an.

Die Degeneration der Retina im Areal beider transplantierter Biomaterialien zeigte histologisch keine Anzeichen für eine entzündliche Nekrose, sondern war auf die Apoptose der Zellen zurückzuführen. Der Zeitpunkt der vollständigen Degradation beider Materialien konnte bis zum Erstellen dieser Dissertation nicht ermittelt werden.

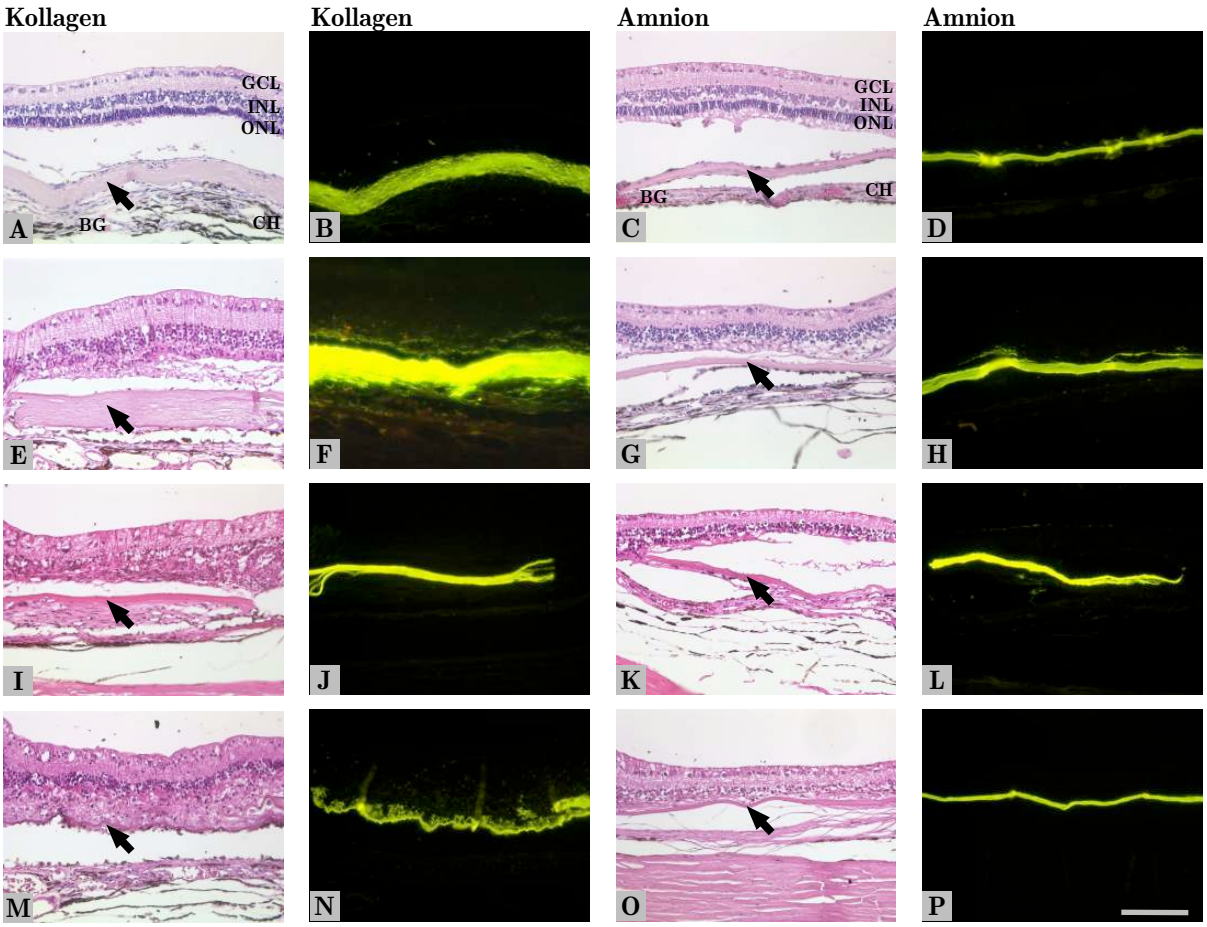


Abbildung 3.39: HE Färbung und Fluoreszenz nativer Paraffinschnitte subretinal transplantierter Kollagen- und Amnionmembranen nach 3 Wochen (A-D) und 5 Wochen (E-H). Im weiteren Verlauf ist Kollagen nach 12 Wochen (I, J) bzw. 38 Wochen (M, N) und Amnion nach 20 Wochen (K, L) bzw. 27 Wochen (O, P) Nachbeobachtungszeit dargestellt. Pfeil $\widehat{=}$ Biomaterial, GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere nukleäre Schicht, ONL = äußere nukleäre Schicht, CH = Choroidea und BG = Blutgefäß. Maßstab $\widehat{=}$ 100 µm.

Kapitel 4

Diskussion

Biomaterialien werden im Bereich des okulären *Tissue Engineering* erforscht, um bei Erkrankungen wie der AMD den Komplex aus degeneriertem RPE und Bruch'scher Membran zu ersetzen und den subretinalen Raum anatomisch und funktionell zu rekonstruieren. Zur Transplantation von Pigmentepithelzellen sind Substratmaterialien essentiell, um die Zellen in einem physiologischen Verband und mit korrekter Polarität zu transferieren [Singh *et al.*, 2001]. Die Anforderungen an das Biomaterial als Zellträger sind vielfältig: Es muss Eigenschaften wie Stabilität bei gleichzeitiger Flexibilität während der Transplantation besitzen, durchlässig für Nährstoffe sein und das Wachstum und die Differenzierung von Pigmentepithelzellen fördern [Hynes and Lavik, 2010]. Die zu transplantierenden Zellen müssen charakteristische Eigenschaften des retinalen Pigmentepithels aufweisen, um die funktionelle Einheit mit Photorezeptoren der Retina erhalten oder wiederherstellen zu können. Im Folgenden werden die experimentellen Ergebnisse der vier untersuchten Biomaterialien Kollagen, Amnion, Seide und Poly-L-Lactid im Vergleich hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Zellsubstrate, sowie die Eignung von RPE bzw. IPE Zellen als Zellersatz diskutiert.

4.1 Materialeigenschaften

Ein Biomaterial als Ersatz für die Bruch'sche Membran muss sowohl in der Zellkultur als auch während der Transplantation leicht zu handhaben sein. Nach der Implantation darf es die physiologischen Prozesse im subretinalen Raum nicht beeinträchtigen.

Die Membranen aus Kollagen, Amnion und Seide lassen sich trotz ihrer minimalen Dicke sehr gut manipulieren, transferieren, färben und zuschneiden. Die Materialien sind autostabil, so dass sie sich in Flüssigkeit entfalten und eine glatte subkonjunktivale Implantation ermöglichen. PLLA Vliese sind sehr fragil und lassen sich schwieriger zuschneiden. Rissbildung oder Porösität wird für PLLA Filme berichtet und führt dazu, dass das Material kaum vom Glasuntergrund gelöst werden kann [Giordano *et al.*, 1997]. Demgegenüber stehen die freitragenden Vliese, da sie ohne Probleme von dem Aluminiumring gelöst werden können und das Material folglich transplantierbar ist. Faltet sich das Material jedoch, lässt es sich nicht mehr glätten, so dass das Vlies für eine subretinale Transplantation in der vorliegenden Struktur nicht verwendet werden kann.

Das Maß an hydrophilen Eigenschaften von Materialoberflächen wird durch die Zusammensetzung der chemischen Gruppen am Polymergerüst bzw. der Aminosäuresequenz bestimmt [King, 1985], [Ko and Ma, 2009], [Ratner, 2004]. Kollagen besteht in der Primärsequenz aus Aminosäuren unterschiedlich reaktiver chemischer Gruppen wie Carboxylgruppen, primäre Aminogruppen und Hydroxylgruppen [Ratner, 2004]. Diese Mischung verursacht keinen hy-

drophoben Effekt, so dass eine ausreichende Hydrophilie für eine Zelladhäsion gegeben ist. Die Ergebnisse der Zellkultur und des Benetzungstests der trockenen Oberfläche bestätigen dies. Schließt man das netzartige Faservlies aus, erlaubt unter den Membranen das Kollagen die beste Diffusion. Die Oberflächenstruktur des Kollagens ähnelt der einer natürlichen extrazellulären Matrix und erleichtert daher die Passage von Molekülen.

Amnion zeigt zwar initial eine größere Hydrophilie als Kollagen, bei Benetzung mit Wassertropfen verringern diese jedoch mit der Zeit ihre Kontaktfläche zum Substrat. Die Basallamina des Amnions enthält zu einem Großteil Heparansulfat und damit saure Proteoglykane mit negativer Ladung, die zu hydrophoben Effekten führen können [King, 1985]. Dies spiegelt sich auch in der Diffusionseigenschaft der Amnionmembran wider, denn ihr Diffusionskoeffizient ist der niedrigste im Vergleich der untersuchten Biomaterialien. Daher ist anzunehmen, dass die Proteoglykane eine Permeabilitätsbarriere für Moleküle darstellen [Toda *et al.*, 2007].

Seide zeigt neben Amnion die höchste initiale Hydrophilie der Oberfläche und im Gegensatz zu Amnion nimmt die Kontaktfläche mit der Zeit sogar zu. Dies spricht für optimale Bedingungen für eine Zelladhäsion. In der Literatur schwanken die Angaben der Kontaktwinkel für Seidenmembranen von 46° [Minoura *et al.*, 1995] bis zu 81° [Jin *et al.*, 2004]. Sie liegen unterhalb von 90° und bestätigen somit die hydrophile Oberfläche. Der Diffusionskoeffizient der Membran ist zwar geringfügig höher als bei Amnion, jedoch benötigt Seide aufgrund seiner Dicke eine deutlich längere Zeit bis zum Konzentrationsausgleich. Beide amorphe Gefüge reduzieren somit die Permeabilität verglichen mit Strukturen wie die der Kollagenmembran.

Poly-L-Lactid ist eine Polyhydroxysäure mit vielen Carbonylgruppen, die dem Material stark hydrophobe Eigenschaften verleihen. Dies ist in der Literatur mit Kontaktwinkeln von 125° beschrieben [Schofer *et al.*, 2009] und stimmt mit den Ergebnissen des Benetzungstests überein, denn hier ist das Vlies das hydrophobste Material. Diese Eigenschaften bewirken auch, dass die Vliese nicht mit dem wasserlöslichen Farbstoff DTAF gefärbt werden können. Aufgrund der netzartigen Struktur der elektrogesponnenen Nanofasern erreichen PLLA Vliese im Vergleich der Biomaterialien den höchsten Diffusionskoeffizienten und damit die beste Permeabilität. Der ermittelte Koeffizient ordnet sich in der gleichen Zehnerpotenz an wie die Referenzgewebe aus humaner und boviner Bruch'scher Membran-Choroidea (BM-CH). Aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften des Materials erreicht der Koeffizient jedoch keinen absolut equivalenten Wert zu den nativen Gewebekomplexen.

Alle vier untersuchten Biomaterialien ermöglichen eine Diffusion von Bromphenolblau Molekülen mit einer molaren Masse von 697 Da. Ionen und Moleküle wie Glukose, Wasser, Milchsäure und Retinol besitzen ein kleineres Molekulargewicht als BPB, so dass ihre Diffusion durch die Biomaterialien sichergestellt ist.

Der Unterschied der Diffusionskoeffizienten der natürlichen Gewebe zu den Biomaterialien ist statistisch signifikant. Dies lässt zunächst vermuten, dass die Diffusion durch die Biomaterialien zu niedrig ist, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Betrachtet man jedoch die Zeiträume bis zu einem annähernden Konzentrationsausgleich, wird deutlich, dass diese bei Kollagen, Amnion und PLLA sehr ähnlich zur humanen BM-CH und weitaus kürzer als bei dem bovinen Gewebe sind. Folglich gleichen diese Biomaterialien einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten über die geringere Materialdicke aus und beeinträchtigen eine Nährstoffdiffusion mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht.

Im Vergleich der natürlichen BM-CH Komplexe erlaubt das humane Gewebe eine geringere Diffusion als das bovine. Humanes Spendermaterial wird nach *post mortem* Zeiten von frühestens 30 Stunden erhalten, die Rinderaugen können dagegen nach etwa drei Stunden präpariert werden. Da zudem die Spender im Mittel 70 Jahre alt waren, erklärt sich hiermit der Unterschied in den Diffusionskoeffizienten. Moore *et al.* machen deutlich, dass die Permeabilität der humanen BM-CH für makromolekulare Proteine mit zunehmendem Alter

nachlässt [Moore and Clover, 2001]. Obwohl in der vorliegenden Studie die Größenordnung der Bromphenolblau Moleküle weitaus niedriger ist, wird die Tendenz der verminderten Diffusion durch ein gealtertes Gewebe deutlich.

Im optimalen Fall wären die Bruch'schen Membranen isoliert von der Choroidea untersucht worden. Da eine Separation der Membran technisch kaum möglich ist ohne ihre Struktur zu schädigen, ist es Standard, den Gewebekomplex aus BM-CH zu verwenden [Hillenkamp *et al.*, 2004], [Lee *et al.*, 2006], [Lu *et al.*, 2007].

Ein direkter Vergleich der Diffusionsergebnisse der Biomaterialien zu Permeationsmessungen anderer Publikationen ist zum Teil schwierig, denn meist werden unterschiedliche physikalische Parameter beschrieben. So gibt es neben Angaben des Diffusionskoeffizienten (Fläche/Zeit) [Lee *et al.*, 2006], [Lu *et al.*, 2007] auch Berechnungen des Permeabilitätskoeffizienten (Länge/Zeit) [Cheruvu and Kompella, 2006] und der Durchflussmenge von Testmolekülen bzw. der hydraulischen Leitfähigkeit von Wasser (Masse/Zeitraum/Fläche) [Hillenkamp *et al.*, 2004], [Moore and Clover, 2001].

Lee und Mitarbeiter untersuchten die Diffusion von FITC-Dextranmolekülen mit einem Molekulargewicht von 376 Da durch humane Linsenkapseln [Lee *et al.*, 2006]. Für dieses natürliche Material ergibt sich ein Diffusionskoeffizient von $9,5 \times 10^{-8}$ cm^2/s. Dieser Wert ist identisch zu dem Diffusionskoeffizienten von $9,47 \times 10^{-8}$ cm^2/s für die Kollagenmembran der vorliegenden Studie. Die hier verwendeten Bromphenolblau Moleküle sind mit einem Molekulargewicht von 697 Da größer als das Dextran. Bezogen auf die Annahme, dass die Permeabilität nur von der Molekülgröße abhängt und nicht von der Ladung [Hussain *et al.*, 2002], ist die Diffusionseigenschaft der Kollagenfolie folglich besser als die der Linsenkapsel.

Mit deutlich größeren FITC-Dextranmolekülen (71.200 Da) untersuchten Lu *et al.* die Diffusion durch Kollagenfilme [Lu *et al.*, 2007]. Da der Diffusionskoeffizient mit $4,1 \times 10^{-10}$ cm^2/s für das Kollagen erheblich niedriger ist, wird auch hier die Abhängigkeit der Diffusion von der Molekülgröße deutlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PLLA im Bezug auf die Diffusionseigenschaften der natürlichen BM-CH am ähnlichsten ist. Dies ist hauptsächlich auf die netzartige Struktur des Vlieses zurückzuführen, denn Milchsäure allein lässt aufgrund der hydrophoben Eigenschaften keine einfache Diffusion von Molekülen in wässriger Lösung vermuten. Die weiteren Biomaterialien in Form einer Folie zeigen eine verminderte Diffusion. Ahir und Mitarbeiter konnten jedoch zeigen, dass durch Zugabe von Matrixmetalloproteasen (MMP) die hydraulische Leitfähigkeit von humanen BM-CH Komplexen stark erhöht wird [Ahir *et al.*, 2002]. Diese Enzyme werden von RPE Zellen in Kultur freigesetzt [Alexander *et al.*, 1990], so dass durch eine Zellbesiedelung die Diffusion durch die Biomaterialien wahrscheinlich verbessert wird.

4.2 Biomaterialien sind geeignete Substrate für Zellwachstum und Zellüberleben von RPE und IPE Zellen

Pigmentepithelzellen, die für eine Transplantation genutzt werden sollen, müssen auf einem Untergrund adhärieren können, um zu überleben [Tezel and Priore, 1997]. Im Alter verändert sich die Bruch'sche Membran zunehmend und ist bei Erkrankungen wie der AMD derart geschädigt, dass sie eine Zelladhäsion nicht mehr unterstützt. Dies wurde sowohl für RPE aber auch IPE Zellen gezeigt [Itaya *et al.*, 2004], [Priore *et al.*, 2006]. Eine intakte Basalmembran dagegen fördert eine epitheliale Differenzierung und verhindert Apoptose [Ohno-Matsui *et al.*, 2005].

Ein Biomaterial als Substrat kann wie eine intakte Basalmembran das Zellwachstum und die Differenzierung unterstützen. Dies wird in der vorliegenden Arbeit sowohl für die RPE Zelllinie ARPE-19 als auch für primäre bovine RPE und IPE Zellen gezeigt.

Die Zellen demonstrieren ein unterschiedlich dichtes bzw. flächiges Wachstum auf den Substraten, wobei die Zellen auf allen vier Biomaterialien große konfluente Areale entwickeln. Die Wachstumsfläche liegt mit $0,78\ cm^2$ deutlich über der Größe, in der das Zell*sheet* Anwendung in der Transplantation fände. Folglich sind die konfluenten Zellareale ausreichend für einen Einsatz im subretinalen Raum. Alle Biomaterialien erfüllen diese Vorbedingung des Zellwachstums und der Formierung in dichten Zellverbänden.

Die untersuchten Biomaterialien fördern das Zellwachstum und -überleben *in vitro* in unterschiedlichem Maße. Da Zellen sensitiv gegenüber allen Aspekten ihres Substrates sind, ist dies nicht ungewöhnlich. *In vitro* zeigen alle drei Zelltypen insgesamt auf Kollagenmembranen das beste Wachstum und die höchsten Vitalitätsraten.

Für die verwendete Kollagenmembran wurden das konfluente Wachstum, die epitheliale Morphologie und perfekte Vitalität von ARPE-19 und primären porcinen RPE bzw. IPE Zellen bereits publiziert [Thumann, 2001], [Thumann *et al.*, 2009]. Diese Ergebnisse stimmen mit der vorliegenden Studie von bovinen Zellen überein und zeigen sich sowohl in der Aufsicht, als auch im Querschnitt. Die Arbeitsgruppe um Lu bestätigt in ihren Studien die Adhäsion und Proliferation von ARPE-19 Zellen auf Kollagenfilmen bis zur Bildung einer konfluenten Monoschicht mit hexagonaler Zellmorphologie [Lu *et al.*, 2007]. Vitalfärbungen von Lu und Mitarbeitern zeigen wenige tote Zellen, die in der vorliegenden Studien noch seltener vorkamen.

Auffällig ist, dass die konfluente Monoschicht der bRPE Zellen auf Kollagen im Gegensatz zur Glaskontrolle homogener bleibt und das Substrat zu keiner Kontraktion der Zellen oder einer Hyperkonfluenz führt. Folglich löst Kollagen keinen übermäßigen Proliferationsreiz aus, sondern unterstützt die Kontaktinhibition der Zellen bei Konfluenz. Auch im Querschnitt wird dies deutlich, denn die Zellen bilden keine Multischichten. Demzufolge ist das Risiko einer vom Material ausgehenden übermäßigen Zellproliferation und ggf. Tumorbildung nach Transplantation stark minimiert.

Weitere Studien betonen ebenfalls die positiven Eigenschaften der Membran. Für porcine IPE Zellen auf Kollagen wird neben dem Wachstum in einer Monoschicht gezeigt, dass die Zellen die Prozedur einer Implantation vertragen und überwiegend vital bleiben [Thumann *et al.*, 2006].

Auch in anderen biomedizinischen Bereichen findet Kollagen in vielfältiger Weise als Substrat experimentelle Anwendung. So ist Kollagen beispielsweise als Matrix für humane glatte Muskelzellen aus der Harnblase geeignet und fördert die Bildung konfluenter Zellverbände [Sharifiaghdas *et al.*, 2009]. Kollagenfilamente als Leitstruktur für die Axonregeneration sind ebenfalls ein vielversprechender Ansatz des neuronalen *Tissue Engineering* [Yoshii and Oka, 2001]. Kollagenschwämme zur Kieferrekonstruktion führen besiedelt mit Stammzellen aus der Pulpa des Zahnes zu einer deutlich schnelleren Regeneration des Operationsareals als eine Implantation des Kollagenschwammes allein [d'Aquino *et al.*, 2009]. Kollagen als Hauptkomponente der natürlichen extrazellulären Matrix wird folglich auch in biotechnologisch modifizierter Form als Substrat von Zellen bevorzugt und ohne Komplikationen angenommen.

Auf Amnion zeigen ARPE-19 und primäre Zellen ähnlich positive Wachstumseigenschaften wie auf Kollagenmembranen. Trotz höherer Hydrophilie der Membran gegenüber Kollagen, breiten sich adhärente Zellen etwas langsamer aus. Hamilton *et al.* publizierten ähnliche Ergebnisse zu der vorliegenden Studie, denn die Zelllinie auf Amnionmembran zeigt sich aufgrund einer dichteren Zellaussaat schon nach einem Tag konfluent. Die Zellen bilden enge Zell-Zell-Kontakte und demonstrieren eine charakteristische Zellform [Hamilton *et al.*, 2007].

Für primäre Zellen beschreiben Ohno-Matsui und Mitarbeiter, dass humane RPE Zellen auf Amnionmembranen initial in kleinen Kolonien von polygonalen, einheitlichen Zellen adhärieren und die Konfluenz aufgrund von Proliferation erreichen [Ohno-Matsui *et al.*, 2005]. Auch im

Querschnitt zeigen sich die Zellen übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit als Monoschicht convex geformter Zellen in Kontakt zur Membran. Eine Kultur der Zellen über zwei Wochen hinaus wird von Ohno-Matsui *et al.* jedoch nicht beschrieben, so dass die in der vorliegenden Studie beobachtete zunehmende Apoptose boviner RPE Zellen nach drei Wochen Kultur nicht bestätigt wird. RPE Zellen aus dem Kaninchen bilden konfluente Zellrasen mit gleichmäßiger Pigmentierung und leicht bipolarer Zellform und halten diesen Status abhängig von der Kulturbedingung vier Wochen bei [Stanzel *et al.*, 2005].

IPE Zellen auf Amnionmembranen wurden ebenfalls von Ohno-Matsui *et al.* untersucht. Sie beschreiben, dass die Zellen zeitgleich zu Zellen auf Plastik konfluent sind und dieselbe Zellmorphologie aufweisen [Ohno-Matsui *et al.*, 2005]. Das untersuchte IPE aus Augen der Ratte und humaner Spender bleibt pigmentiert, weist morphologische Eigenschaften von RPE Zellen auf [Ohno-Matsui *et al.*, 2006] und stimmt somit mit den Ergebnissen der bovinen IPE Zellen in der vorliegenden Studie überein.

Andere okuläre Zelltypen, wie die Epithelzellen des Limbus, werden erfolgreich auf Amnionmembranen kultiviert [Koizumi *et al.*, 2007]. Die Zellen differenzieren besser auf Amnion, dessen Epithel zuvor entfernt wurde, als auf dem natürlich belassenen Material. Das Zell*sheet* ist hier ein erfolgversprechender Ansatz zur Transplantation auf die Augenoberfläche zur Rekonstruktion verletzter Corneae.

Zur Entwicklung eines Haut-Äquivalents wird die Amnionmembran als Substrat für humane Keratinozyten ebenfalls untersucht [Yang *et al.*, 2006]. Die Zellen bilden eine definiertere Schichtung als auf einem Kollagengel und entsprechen in ihrer Expression von Markermolekülen einer natürlichen Haut. Auch für vaskuläre Endothelzellen des Schweines ist die humane Amnionmembran eine ideale Matrix zur Entwicklung eines funktionellen Endothels im Rahmen der Blutgefäßrekonstruktion [Tsai *et al.*, 2007]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch Amnionmembranen nach Entfernung der Epithelzellschicht ein differenziertes Zellwachstum positiv unterstützt.

Auf Seide tritt keine Konfluenz der Zellen während der Kultivierungszeit ein, die Morphologie der Zellen erweist sich innerhalb dichter Verbände jedoch als gut. Das Zellwachstum ist im Vergleich zu den anderen Substraten verlangsamt und die Vitalitätsrate geringer als auf Kollagen und Amnion. Darüber hinaus kontrahieren die primären Zellen in der zweiten Kulturwoche.

Daraus lässt sich schließen, dass die Oberfläche der Seide trotz der hohen Hydrophilie die Zelladhäsion erschwert und eine Proliferation wenig unterstützt. Das Phänomen der Kontraktion ist im Zusammenhang mit abnormalem Verhalten von RPE Zellen, wie z.B. bei der proliferativen Retinopathie (PVR) bekannt. Diese geht einher mit der Kontraktion und Migration von RPE Zellen und wird durch die Expression und Funktion von Integrinrezeptoren beeinflusst [Hoffmann *et al.*, 2005]. Die Seide scheint in der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren nicht genügend Sequenzen zu enthalten, die von den Integrinen in der RPE Zellmembran als Verankerungspunkt genutzt werden können.

Weder Zellkulturen von RPE noch IPE Zellen auf Seide sind in der Literatur publiziert. Für andere Zelllinien, wie z.B. Fibroblasten aus der Maus, wird ebenfalls die Fähigkeit zur Zelladhäsion und Proliferation auf Seidenfilmen beschrieben [Minoura *et al.*, 1995]. Der Vergleich von Seidenmaterialien mit verschiedenen Sericinanteilen resultiert in deformierten Zellmorphologien je höher der Sericinanteil in den Filmen ist. In der vorliegenden Studie werden Seidenmembranen verwendet, in denen kein Sericin enthalten ist. Dies erklärt, dass die Morphologie in der Kultur auf Seide nicht beeinträchtigt ist und stellt somit die besseren Eigenschaften der hier verwendeten Seide heraus.

Eine schnellere Zellexpansion beschreiben Tigli und Mitarbeiter für mesenchymale Stammzellen und Chondrozyten in dreidimensionalen Seidengerüsten im Vergleich zu Chitosanschwämmen. Begründet wird dies mit dem größeren Porendurchmesser des Seidenmaterials, der eine bessere Nährstoffversorgung der Zellen ermöglicht [Tigli *et al.*, 2009]. Trotzdem wird

deutlich, dass Seide grundsätzlich als Substrat von Zellen angenommen wird. Bestätigt wird dies von einer anderen Arbeit mit mesenchymalen Stammzellen auf Seidenmembranen, in der die Zellen ein konfluentes und besseres Wachstum als auf Plastik demonstrieren [Meinel *et al.*, 2005]. Auch in Publikationen für okuläre Zelltypen wie Limbusepithelzellen [Chirila *et al.*, 2008] oder corneale Fibroblasten [Lawrence *et al.*, 2009] wird ein Zellwachstum auf Seide ähnlich zu Plastik beschrieben und stellt damit vor allem eine Alternative für Amnion im Bereich der Cornearekonstruktion dar.

ARPE-19 Zellen auf PLLA Nanovliesen zeigen im Vergleich zu den anderen untersuchten Materialien eine verlangsamte Adhäsion und Proliferation zu Beginn der Kultivierung. Im weiteren Verlauf entwickeln sie sich zu größeren Zellverbänden als auf Seide, trotzdem wird keine Konfluenz erreicht. Hierzu korrespondieren Ergebnisse von Giordano und Mitarbeitern. Humane fetale RPE Zellen auf PLLA Filmen zeigen eine verlangsamte Adhäsion im Vergleich zu Plastikkulturen, bilden aber innerhalb von acht Tagen in großen Arealen konfluente Zellmonoschichten aus [Giordano *et al.*, 1997].

Auf Polymerfilmen bestehend aus Kopolymeren verschiedener PLLA Anteile (PLGA) adhärieren und proliferieren ARPE-19 Zellen und bilden konfluente Zellrasen [Huhtala *et al.*, 2007]. Ein nur marginaler zytotoxischer Effekt auf die Zellen wird beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die hohe Sterberate auf den freitragenden Fasern der vorliegenden Studie nicht nur auf das PLLA selbst zurückzuführen ist, sondern auf die netzartige Nanofaserstruktur in verschiedenen Ebenen. Diese stellt den Zellen kaum Fläche für eine Ausbreitung bereit und erschwert den Kontakt zu anderen Zellen. Zudem sind die Fasern hydrophob, so dass die initiale Adhäsion beeinträchtigt wird. Eine Zelladhäsion muss jedoch gewährleistet sein, um Apoptose zu verhindern [Tezel and Priore, 1997]. Dass die Materialstruktur des Faservlieses der limitierende Faktor für das Zellwachstum ist, unterstreichen auch die Ergebnisse der PKH26 Färbung und der immunhistochemischen Färbungen von ARPE-19 Zellen auf PLLA beschichteten Glasplättchen. Denn auf der filmartigen Fläche des gleichen Polymers entwickeln die Zellen eher konfluente Zellverbände mit einzelnen Übereinanderlagerungen von Zellen.

In der Literatur ist beschrieben, dass primäre humane und porcine RPE Zellen auf PLLA Filmen adhärieren und proliferieren [Hadlock *et al.*, 1999]. Langsamer als Kulturen auf Plastik bilden sie innerhalb von zwei Wochen einen konfluenten Zellrasen. Die Vitalitätsrate der pRPE Zellen beträgt 88% auf PLLA. All diese Charakteristiken stimmen mit der vorgestellten Studie mit bovinen Zellen überein. Hadlock *et al.* beschreiben zudem eine inhomogene Gesamterscheinung des Verbandes durch wenige, sich nicht teilende und daher stark pigmentierte Zellen zwischen kleineren und schwächer pigmentierten Zellen. Dies wird in den vorliegenden Kulturen nicht beobachtet, denn die Zellen im Verband sind in ihrer Pigmentierung homogen.

Die Kultivierung von IPE Zellen auf PLLA Nanovliesen ist bisher nicht veröffentlicht. Für retinale Vorläuferzellen zeigt eine Studie von PLLA und PLLA-Kopolymer-Gerüsten als Substrat, dass die Zellen sich vollständig in das Material eingliedern und nach subretinaler Transplantation in Augen von Mäusen vier Wochen überleben [Tomita *et al.*, 2005]. Damit wird wie für Seide eine grundsätzliche Eignung des PLLA als Substrat bestätigt. Auch corneale Epithelzellen adhärieren und proliferieren auf und in PLGA Gerüsten. Jedoch konnte die Anzahl adhärierender Zellen mit Beschichtungen aus Kollagen oder Komponenten des Amnions gesteigert werden [Lee *et al.*, 2003]. Solche Optimierungsmaßnahmen sind für das PLLA der vorliegenden Arbeit ebenfalls denkbar.

Über die in der vorliegenden Studie untersuchten Biomaterialien hinaus, entwickeln RPE und IPE Zellen auch auf anderen Substraten Monoschichten. Beutel *et al.* publizierten dies für porcine Zellen auf der inneren limitierenden Membran (ILM), die die Basalmembran der Müllerzellendfüße der Retina bildet. Humanes RPE von Spenderaugen adhäriert im Gegensatz zu ARPE-19 Zellen jedoch nicht auf der ILM [Beutel *et al.*, 2007]. Auf der Descemet-Membran

der Cornea bilden porcine und bovine IPE wie auch RPE Zellen Monoschichten mit ähnlicher Morphologie aus [Thumann *et al.*, 1997].

Auch die humane Linsenkapsel wird als potentielles Substrat für Zellkulturen untersucht. RPE Zellen humanen und porcinen Ursprungs bilden nach wenigen Tagen konfluente Zellverbände, so dass auch diese Membran ein Zellwachstum fördert [Singh *et al.*, 2001]. Eine andere Studie schildert, dass porcines IPE auf anterioren Linsenkapseln länger eine Monoschicht aufrechterhält als RPE Zellen [Hartmann *et al.*, 1999]. Diese Kultur wird zehn Tage beobachtet und beschreibt damit einen deutlich kürzeren Zeitraum als die vorliegende Studie. Hier werden auf den Biomaterialien mit Ausnahme der Seide stabile und vitale Kulturen über vier Wochen dokumentiert.

Wie die primären RPE Zellen zeigen auch IPE Zellen in Kultur auf Glas und auf den Biomaterialien alle Eigenschaften differenzierter Pigmentepithelzellen. IPE Zellen adhärieren nach der Präparation in einer geringeren Zahl als RPE Zellen und zeigen im Vergleich zu diesen ein verlangsamtes Zellwachstum und weniger Proliferation. Die Zellen wachsen, wie auch von Rezai und Mitarbeitern beschrieben, in initialen Zellnestern an, aus denen sich dann konfluente Monoschichten bilden [Rezai *et al.*, 1997a]. In ihrem Erscheinungsbild sind IPE Kulturen kaum von RPE Zellen zu unterscheiden, was bereits für Kaninchenzellen beschrieben wurde [Thumann, 2001]. Insgesamt weisen IPE Zellen auf allen Biomaterialien eine bessere Vitalitätsrate als RPE Zellen auf. Dies zeigt, dass IPE Zellen eine hohe Anpassungsfähigkeit an Kultur- und Umgebungsbedingungen besitzen. Sie erhalten ihre epitheliale Morphologie und sind daher als Zellersatz für RPE Zellen geeignet.

Sowohl IPE als auch RPE Zellen zeigen im Verlauf der ersten zehn Tage auf allen untersuchten Biomaterialien ein Wachstum zu differenzierten Zellverbänden. Für einen Einsatz in der Transplantation erscheint daher eine Kultivierungszeit von bis zu zwei Wochen optimal, um homogene Monoschichten zu erhalten und Phänomene wie Apoptose oder Kontraktion der Zellen zu vermeiden. Dass die Zellen nach dieser Kultivierungsdauer nicht nur morphologisch ihre Differenzierung aufrechterhalten, sondern auch im Hinblick auf die Expression RPE charakteristischer Gene und Proteine, wird in Kapitel 4.4 der vorliegenden Arbeit diskutiert.

Ein anderer Aspekt der Zellkultur stellt die Markierung der Zellen mit Vitalfarbstoffen dar. Dies ist wichtig, um die Zellen nach einer Transplantation eindeutig identifizieren zu können. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Vitalfarbstoff PKH26 färbt sowohl ARPE-19 als auch primäre bRPE und IPE Zellen ohne eine Beeinträchtigung des Zellwachstums. Eine Studie von Haas und Mitarbeitern zeigt die Anwendung der Zellmarkierung *in vivo*. Neuronale Vorläuferzellen werden nach PKH26 Markierung in das Mesencephalon von Ratten injiziert. Anhand der stark roten Fluoreszenz können die Zellen lokalisiert und ihre Migration bzw. ihr Überleben verfolgt werden [Haas *et al.*, 2008].

4.3 Barriereeigenschaften von ARPE-19 Zell*sheets* werden durch das Biomaterial nicht beeinflusst

Das retinale Pigmentepithel wird als dichtes Epithel klassifiziert, denn der parazelluläre Widerstand im differenzierten Zellverband ist zehnfach höher als der transzelluläre Widerstand [Strauss, 2005]. Das Ausmaß, mit dem der elektrische Strom dem passiven parazellulären Pfad folgt, wird durch den junktionalen Komplex zwischen Zellen determiniert, so dass Messungen des transepithelialen Widerstandes Aussagen über die Ausbildung von *tight junctions* erlauben [Cereijido *et al.*, 1978].

Die gemessenen Widerstände entsprechen dem Wachstumsverhalten der ARPE-19 Zellen. Zu Beginn der Kultur ist die Zelldichte gering, so dass der elektrische Strom ungehindert

durch die Substrate fließen kann und kein Widerstand aufgebaut wird. Ein konfluenter Zellverband dagegen lässt sich anhand des messbaren transepithelialen Widerstandes feststellen [Brayden *et al.*, 1988]. Bleiben die Werte der Messung auf einem hohen Niveau konstant, spricht dies für eine etablierte Monoschicht mit korrekt formierten *tight junctions* [Nabi *et al.*, 1993].

Im konfluenten Zustand verändert sich ein intakter Zellrasen grundsätzlich nicht, es kann aber zum Herauslösen einzelner Zellen aus dem Verband kommen, was zu einem leichten Absinken der TER Werte führt. Auf *Inserts*, Amnion und Seide ist dies der Fall, auf Kollagen dagegen bleiben die Messwerte stabil. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Zellkultur und Vitalität von ARPE-19 sowie der primären Zellen überein, denn nur auf Kollagen bleibt der konfluente Rasen über die gesamte Kulturdauer homogen. Auf Amnion und Seide werden dagegen Kontraktionen und Apoptose der Zellen beobachtet. Auf PLLA Vliesen ist keine TER Messung möglich, da sich der Zellverband im Fasernetzwerk nie zu einer vollständigen Konfluenz entwickelt.

Die in dieser Arbeit ermittelten maximalen Widerstände von 26 Ωcm^2 für ARPE-19 auf *Inserts* sind vergleichbar mit anderen Publikationen. Die Arbeitsgruppe um Luo beschreibt einen mittleren Widerstand von 21 Ωcm^2 von ARPE-19 Zellen auf *Inserts* [Luo *et al.*, 2006]. Widerstände um 25 Ωcm^2 werden im Kulturzeitraum von zwei Wochen in retinalen Pigmentepithelzellen von Bai *et al.* gemessen [Bai *et al.*, 2008], so dass die Ergebnisse dieser Studie funktionelle *tight junctions* bestätigen.

Unterschiede in den Barriereeigenschaften von ARPE-19 Zellen durch die Kultivierung auf verschiedenden Biomaterialien können jedoch nicht gezeigt werden. Aufgrund der geringen Unterschiede der Messwerte und hohen Standardabweichungen zwischen Zellen auf Kollagen, Amnion und Seide ergibt sich kein signifikanter Einfluss eines der Materialien auf die Ausbildung von *tight junctions*.

Die Widerstände der Zellen auf Kollagen, Amnion und Seide liegen in den Ergebnissen dieser Untersuchung bei maximal 14 Ωcm^2. Ein manuelles Einspannen von Biomaterialien in einen Zellkultureinsatz birgt den Nachteil, dass das System mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht absolut dicht ist. Elektrische Ströme finden einen Weg am Zellverband vorbei und lassen folglich den Widerstand niedriger erscheinen, als er tatsächlich ist. Die durchweg höheren Messwerte auf den *Inserts* im Vergleich zu den Biomaterialien trotz konfluenter Monoschichten unterstützen diese Annahme. Ein System, um Biomaterialien absolut dicht einzuspannen, kann im Rahmen dieser Studie nicht etabliert werden.

Grundsätzlich belegt neben den gemessenen Widerständen auch der immunhistochemische Nachweis von ZO-1 im Anschluss an die TER Messreihe, dass *Inserts*, Kollagen, Amnion und Seide eine Etablierung von dichten Zellverbänden ermöglichen. Auch die Studie der Proteinexpression auf den vier Biomaterialien zeigt, dass ARPE-19 Zellen sowohl Aktinfilamente als auch ZO-1 Proteine synthetisieren. In differenzierten RPE Zellen sind beide Proteine apikal lokalisiert, so dass die Fluoreszenzfärbung voll entwickelte junktionale Komplexe und eine korrekte Zellpolarität belegen [Luo *et al.*, 2006], [Singh *et al.*, 2001]. Des Weiteren wird auch in der Genexpressionsanalyse von primären RPE Zellen auf den Biomaterialien die ZO-1 Expression bestätig.

Kanuga und Mitarbeiter zeigen eine Korrelation zwischen einer kontinuierlichen ZO-1 Proteinexpression und funktionellen Zell-Zell-Kontakten. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beobachten sie mitunter kleine Unregelmäßigkeiten der Proteinmarkierung und beschreiben dies als konsistent mit gemessenen Widerständen von maximal 30 Ωcm^2 [Kanuga *et al.*, 2002].

Die Messwerte weiterer Forschungsgruppen liegen meist höher als die im Ergebnisteil beschriebenen. Dunn *et al.* stellen in ihrer Erstbeschreibung der ARPE-19 Zelllinie Widerstandswerte von 35 Ωcm^2 nach zwei Wochen Kultur vor. Damit bestätigen sie, dass die Zellen differenzierte Eigenschaften innehaben und *tight junctions* ausbilden. Der relativ geringe TER Wert im Vergleich zu Primärkulturen rührt eher von einer Heterogenität der Zelllinie her als von einer

fehlenden Differenzierung [Dunn *et al.*, 1996]. Kannan *et al.* zeigen, dass ARPE-19 Zellen nach einem Monat ein Plateau bei durchschnittlich 47 Ωcm^2 entwickeln; ebenso wie Ablonczy und Mitarbeiter, bei deren Untersuchung die Zelllinie zwischen zwei und fünf Wochen einen stabilen Widerstand von 45 Ωcm^2 aufrechterhält [Ablonczy and Crosson, 2007], [Kannan *et al.*, 2006].

Im Allgemeinen wird die Methode der Widerstandsmessung genutzt, um Auswirkungen eines Zusatzes im Kulturmedium auf die Barriereeigenschaften von Pigmentepithelzellen zu untersuchen, nicht aber einen Effekt des Wachstumsuntergrundes. Beispielsweise wird der Einfluss von VEGF oder ein Schaden durch oxidativen Stress auf *tight junctions* analysiert [Ablonczy and Crosson, 2007]. Auch Farbstoffe, die während operativer Eingriffe am Auge Einsatz finden, werden mittels TER in ihrer Wirkung auf die Barriereeigenschaften von ARPE-19 Zellen beurteilt [Kannan *et al.*, 2006], [Mennel *et al.*, 2008], [Thurman *et al.*, 2009]. In diesen Versuchen werden *Inserts* mit Membranen aus Polycarbonat oder Polyester und mit verschiedenen Porengrößen verwendet. Allein solche Unterschiede beeinflussen die Ergebnisse der Widerstandsmessungen, denn beispielsweise die Verwendung verschiedener *Inserts* bei gleichartiger Kultivierung der Zellen ergibt in der Publikation von Mennel *et al.* höhere Messwerte als in dieser Studie [Mennel *et al.*, 2008].

Darüber hinaus machen Luo *et al.* deutlich, dass ARPE-19 eine Zelllinie ist, die heterogene Charakteristiken bezüglich der Expression von Zytoskelett- und *tight junction* Proteinen wie Claudin und ZO-1 aufweist [Luo *et al.*, 2006]. Folglich sind auch gemessene Widerstände von der Kultivierung der Zellen, der verwendeten Passage und der Zusammensetzung des Mediums abhängig, wodurch sich wiederum die Bandbreite der gemessenen Werte verschiedener Forschungsgruppen erklärt.

4.4 Biomaterialien begünstigen eine RPE charakteristische Gen- und Proteinexpression

Untersuchungen auf der Genexpressionsebene ermöglichen Aussagen über die grundsätzliche genetische Ausstattung von Zellen. Einflüsse der Umgebung und damit des Wachstumssubstrates auf die Expression von RPE charakteristischen Genen können anhand einer quantitativen Expressionsstudie im Vergleich zu Standardkulturen auf Plastik verdeutlicht werden. Darüber hinaus kann durch den Vergleich der Genexpressionsmuster von primären bovinen RPE mit IPE Zellen das Potential der IPE Zellen als Ersatz für degenerierte RPE Zellen beurteilt werden.

Primärzellen können eine *in situ* Situation besser widerspiegeln als Zelllinien, so dass in dieser Studie bovine Primärkulturen verwendet wurden. Allerdings bringt das Arbeiten mit Primärkulturen stärkere Schwankungen der Ergebnisse mit sich als Experimente mit Zelllinien. Dies erklärt, warum die Referenzkulturen auf Plastik sowohl für bRPE als auch bIPE Zellen nicht immer die geringste Standardabweichung der CP Werte im Vergleich zu den Biomaterialien aufweisen.

Während der Kultivierung von bRPE und bIPE Zellen werden Unterschiede in der Zelldichte und teils auch in der Morphologie deutlich. Dies kann neben den zu erwartenden Unterschieden in Primärkulturen auch an Faktoren wie schwankenden *post mortem* Zeiten der Rinderaugen und dem Erfolg der Präparation liegen. Zudem verursachen mitunter andere Fertigungsauflagen eines Biomaterials morphologische Variationen zwischen den Kulturen, was anhand von bRPE Zellen auf Seide deutlich wird. Dennoch zeigen sich in der Genexpression der Zellen keine deutlichen Abweichungen, denn gerade auf Seide erweisen sich die statistischen Daten als sehr einheitlich.

Aufgrund von unterschiedlichen Ausbeuten an Gesamt-RNA war es nicht möglich, für alle Testgene die gleiche Menge an cDNA im Reaktionsansatz einzusetzen (vgl. Kapitel 3.6.3). Drei Mikroliter an cDNA im Vergleich zu zwei Mikrolitern führen in der Tendenz zu niedrigeren CP Werten. Daher ist die Klassifizierung in niedrig oder stark exprimierte Gene weniger als absolut

denn als richtungsweisend zu verstehen.

In der Gesamtheit dieser Genexpressionsstudie werden auf Biomaterialien in Bezug zur Kultivierung auf Plastik etwa die Hälfte der Gene verstärkt exprimiert, die andere Hälfte dagegen nicht bzw. herunter reguliert. Zwischen den vier Biomaterialien, aber auch zwischen den beiden Zelltypen bRPE und bIPE, ist die Genregulation sehr unterschiedlich. Dies entspricht den Erwartungen, denn verschiedene Autoren schildern, dass die Mikroumgebung das Zellverhalten beeinflusst und Zellen durchaus ihr Genexpressionsprofil abhängig vom Umfeld und somit auch vom Substrat ändern [Benton *et al.*, 2008], [Cai *et al.*, 2006], [Streuli, 2009].

Generell beschreibt die Literatur, dass kultivierte RPE Zellen im Vergleich zur *in situ* Situation die Expression vieler Gene vermindern oder ändern [Kociok *et al.*, 1998]. Dies ist auch für Epithelzellen nicht-okulären Ursprungs belegt: Genexpressionsstudien von primären β-Zellen des Pankreas zeigen in Kultur einen Verlust der epithelialen Marker bei gleichzeitigem Anstieg der Expression mesenchymaler Gene [Russ *et al.*, 2009]. Auch auf Proteinebene reduzieren Zellen ihre Expression in Standardkulturen auf Plastik gegenüber Zellen *in situ*. Alge und Mitarbeiter demonstrieren dies in humanen RPE Zellen für die Enzyme RPE65 und CRALBP. Begründet wird die verringerte Proteinexpression damit, dass während der Translation mRNA Transkripte verwendet werden, die wiederum von DNA Sequenzen abgelesen wurden [Alge *et al.*, 2003]. Somit rührt eine verringerte Proteinexpression ursächlich von einer reduzierten Genexpression oder aber von inhibitorischen, post-translationalen Mechanismen her [Thumann *et al.*, 1999b].

Korrespondierend zu den Ergebnissen von Alge *et al.* wird in bRPE Zellen eine verminderte Genexpression von RPE65 und CRALBP auf allen Materialien im Vergleich zu Plastikkulturen beobachtet. Beide Enzyme sind essentiell für die Regeneration von 11-cis-Retinal zwischen retinalem Pigmentepithel und Photorezeptoren. Da in der Zellkultur keine Kommunikation zwischen dem primären RPE und Photorezeptoren stattfinden kann, ist anzunehmen, dass Signale seitens der neuronalen Zellen fehlen, welche die Expression von RPE65 und CRALBP positiv beeinflussen. Dennoch kann in der vorliegenden Studie die Proteinexpression von RPE65 auf allen Biomaterialien in ARPE-19 Zellen mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Sie belegt, dass grundsätzlich eine Differenzierung von Zellen auf allen Substraten stattfindet, denn gerade unter *in vitro* Bedingungen kann die Expression dieses Proteins herunterreguliert werden und ist nicht mehr nachweisbar [Stanzel *et al.*, 2005].

Eine Genexpressionsanalyse von bovinen Irispigmentepithel Zellen direkt nach Isolation zeigt, dass die *in situ* Expression von RPE65 im Vergleich zu RPE Zellen sehr gering ist [Thumann *et al.*, 1999b]. In der vorliegenden Studie wird in IPE Zellen auf Biomaterialien die Expression des Gens für RPE65 jedoch zum Teil hochreguliert. Somit wird deutlich, dass IPE Zellen mehr als RPE Zellen in der Lage sind, abhängig von ihrem Substrat die Expression des RPE65 Gens zu erhalten.

Auf allen Biomaterialien in bRPE Kulturen sowie auf Amnion und PLLA in bIPE Zellen ergibt sich im Median eine erhöhte Genexpression für Keratin 8, ein Intermediärfilament und Teil des Zytoskeletts. Die Zusammensetzung der Cytokeratine in RPE Zellen variiert je nach Kulturbedingung und Differenzierungsstatus der Zelle. Alge *et al.* beobachten sowohl in differenzierten, als auch in dedifferenzierten RPE Zellen die Expression von Keratin 8 [Alge *et al.*, 2003]. Andere Autoren publizieren zum einem generell eine Reduktion der Keratinexpression für RPE Zellen in Kultur und zum anderen, dass das Fehlen einzelner Keratine keine negativen Auswirkungen auf die Zellfunktion hat [Marmor and Wolfensberger, 1998]. Diesen Veröffentlichungen zufolge haben die in der vorliegenden Expressionsanalyse beobachteten Regulationen der Keratine keinen signifikanten Einfluss auf den Differenzierungsstatus der RPE und IPE Zellen.

Anhand der immunhistochemischen Färbungen in der vorliegenden Arbeit werden Cytokeratine in ARPE-19 Zellen auf allen Biomaterialien nachgewiesen. Der grundsätzlich epitheliale

Charakter der Zellen wird durch die Synthese von Cytokeratin Proteinen belegt, denn diese Intermediärfilamente werden fast ausschließlich in Epithelzellen exprimiert [Liggett *et al.*, 2009], [Marmor and Wolfensberger, 1998]. Auch auf Proteinebene beeinflusst keines der Substrate die Ausbildung dieser Zytoskelettkomponente signifikant.

Die Wachstumsfaktoren VEGF und PEDF wirken bezüglich der Angiogenese gegenläufig. Beide Faktoren werden von RPE Zellen sezerniert und schaffen ein Gleichgewicht, das ausschlaggebend für die Integrität der Choriokapillaris ist. Ohno-Matsui *et al.* beobachten in Genexpressionsanalysen von differenziertem humanem RPE auf Lamininbeschichtungen, dass PEDF hochreguliert, in dedifferenziertem RPE auf Plastik jedoch nicht nachweisbar ist [Ohno-Matsui *et al.*, 2001]. In der hier vorliegenden Genexpressionsanalyse spräche dies für eine unvollständige Differenzierung der bRPE Zellen auf Kollagen, Amnion und PLLA, denn nur auf Seide ist die PEDF Expression erhöht. Ferner publiziert die Arbeitsgruppe um Ohno-Matsui in differenzierten Zellen einen Anstieg der PEDF Expression als Reaktion auf eine erhöhte VEGF Expression. Dieses Phänomen wird im Gegensatz zum RPE für die IPE Zellen auf allen vier Biomaterialien bestätigt. Das natürliche Verhältnis von PEDF mit seinen anti-angiogenen Eigenschaften zu dem pro-angiogenen Faktor VEGF wird folglich in kultivierten bIPE Zellen bewahrt.

Die Genexpression für das *tight junction* Protein ZO-1 wird ebenfalls in bIPE Zellen stärker reguliert als in RPE Zellen. Auf Kollagen und Seide ergibt sich eine deutlich erhöhte ZO-1 Expression in IPE Zellen, wogegen auf Amnion und PLLA sowie in RPE Zellen auf allen Biomaterialien kaum eine Regulation stattfindet. Als Komponente zur Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke ist die verstärkte Expression dieses Gens ein weiterer Hinweis auf das Potential von IPE Zellen, Funktionen des retinalen Pigmentepithels ausführen zu können. Die morphologische Ausbildung des ZO-1 auf Proteinebene in ARPE-19 Zellen zeigt, dass der Differenzierungszustand der Zellen auf allen Biomaterialien hinreichend ist und somit auch bei geringer Regulation im Vergleich zu Standardkulturen in RPE Zellen gehalten wird. Übereinstimmend mit der Genexpressionsstudie der IPE Zellen ist die kortikale Anordnung des ZO-1 Proteins in ARPE-19 Zellen auf Kollagen und Seide homogener als auf der Amnionmembran und PLLA.

CD86 ist ein weitverbreitetes Antigen auf Makrophagen und somit indirekt an der Immunabwehr beteiligt [Kanuga *et al.*, 2002]. RPE Zellen exprimieren CD86 konstitutiv und scheinen diese makrophagen-ähnliche Eigenschaft in Zusammenhang mit der auch immunologisch wirksamen Blut-Retina-Schranke zu nutzen [Elner *et al.*, 1992].

Im Gegensatz zu Angaben in der Literatur [Marmor and Wolfensberger, 1998] wird CD86 in der vorliegenden Untersuchung während der Kultivierung boviner RPE Zellen nicht generell verstärkt exprimiert. Eine deutliche Hochregulation zeigt sich zwar in bRPE auf Kollagen, Seide und Amnion; auf PLLA findet jedoch keine signifikante Regulation statt. In IPE Zellen wird das CD86 Gen auf Kollagen nicht reguliert, auf Amnion und PLLA vermindert exprimiert und nur auf Seide deutlich hochreguliert. Folglich scheinen die *in vitro* Konditionen eine Immunreaktion auszulösen, die durch Einflüsse der Substrate PLLA und Amnion jedoch reduziert wird. Für PLLA steht dies im Gegensatz zu der Biokompatibilitätsstudie *in vivo* (vgl. Kapitel 4.5.2). Allerdings fehlen unter Kulturbedingungen Einflüsse eines umliegenden Gewebeverbandes, die eine sensitivere Reaktion hervorrufen könnten.

Bezüglich der Biomaterialien erweist sich PLLA für RPE Zellen eindeutig als das ungünstigste Material, um differenzierte Eigenschaften in Kultur zu bewahren. Die meisten Zielgene werden zum Teil stark vermindert exprimiert und unterliegen großen Schwankungen zwischen den drei Kulturen. Schon während der Kultivierung wird deutlich, dass die RPE Zellen auf den Nanofasern zum Teil eine kugelige Morphologie aufweisen. Dieses Anzeichen für eine unvollständige Differenzierung der Zellen auf PLLA wird in der Genexpressionsstudie bestätigt.

Seide ist aufgrund der deutlichen Aktivierung von CD86 und der reduzierten Expression von RPE65 im Vergleich zur Standardkultur auf Plastik ebenfalls kein bevorzugtes Material, um die

Differenzierung der RPE Zellen zu bewahren. Zudem wird durch die Markierung der Aktinfilamente auf Proteinebene deutlich, dass die Zellen mit der Ausbildung von Stressfasern auf das Biomaterial reagieren. Einen signifikanten Einfluss der Seidenstruktur auf die Zellmorphologie zeigen Lawrence und Mitarbeiter für corneale Endothelzellen: Die Aktinfilamente werden in den Zellen entlang von Furchen im Seidensubstrat ausgerichtet und vornehmlich in den Zellfortsätzen nachgewiesen [Lawrence *et al.*, 2009].

Kollagen und Amnion bewirken die Hochregulation einzelner Gene. Hierbei ist kein Material dem anderen eindeutig vorzuziehen, denn Kollagen erhöht CD86 deutlich, Amnion dagegen reduziert die RPE65 und PEDF Expression stark. In Untersuchungen von humanen RPE Zellen auf Amnion zeigen Ohno-Matsui *et al.* eine erhöhte Expression von RPE65 und PEDF und beschreiben die Amnionmembran als geeignet, um den Phänotyp von RPE Zellen zu konservieren [Ohno-Matsui *et al.*, 2005]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der hier dargestellten Genexpressionsanalyse.

Um die Epithelschicht des Amnions zu entfernen, werden die Membranen der vorliegenden Studie mit einem anderen proteolytischen Enzym behandelt, als von Ohno-Matsui beschrieben [Ohno-Matsui *et al.*, 2005]. Dies bewirkt möglicherweise, dass die Komponenten der Basalmembran unterschiedlich angegriffen werden und folglich heterogene Signale an Zellen aussenden. Durch eine alternative Enzymbehandlung könnte das Amnion als Substrat für RPE Zellen optimiert werden.

Für IPE Zellen ist Kollagen das Material, welches am besten die RPE charakteristische Genexpression unterstützt. Im Vergleich zu den anderen Biomaterialien werden hier die untersuchten Zielgene am wenigsten herunter reguliert und wichtige Faktoren wie PEDF und ZO-1 vermehrt exprimiert. Dies ist auch in IPE Zellen auf Seide der Fall. Die ausserordentlich hohe Expression von CD86 als Marker für eine Immunreaktion überwiegt jedoch als negative Eigenschaft für dieses Wachstumssubstrat. Amnion führt in IPE Zellen zu einer reduzierten Expression von Genen des Retinolstoffwechsels und einer geringeren Hochregulation von ZO-1 im Vergleich zu Zellen auf Kollagen. Ähnlich zu Ergebnissen der vorliegenden Studie schlussfolgern Ohno-Matsui *et al.* für IPE Zellen auf Amnion, dass das Biomaterial die Zellen nicht ausreichend fördert, um RPE charakteristische Eigenschaften anzunehmen [Ohno-Matsui *et al.*, 2006]. Jedoch vergleichen die Autoren dies mit ihren bereits erwähnten Ergebnissen der Expressionsstudie für RPE Zellen auf Amnion. PLLA begünstigt in IPE Zellen im Gegensatz zu RPE Zellen die Expression von RPE65 und PEDF. Da das Gen für CD86 in der Tendenz vermindert exprimiert wird, ermöglicht PLLA für diesen Zelltyp verglichen mit den Standardkulturbedingungen eher eine RPE charakteristische Expression.

Zusammenfassend sind die untersuchten Biomaterialien geeignet, einen Großteil des RPE charakteristischen Genexpressionsprofils von kultivierten RPE Zellen zu erhalten bzw. zu begünstigen. Dabei beeinflussen sie unterschiedliche Bereiche der Physiologie und des Zytoskeletts. Um Differenzen in der Genexpression aufgrund der Kultivierung auf den verschiedenen Biomaterialien umfassender zu analysieren, ist die Anwendung eines Genchips denkbar. Weitere Studien im Rahmen einer Transplantation von Zell*sheets* in den subretinalen Raum könnten klären, welches Material die Zellen in Kultur am besten konditioniert, so dass im Zusammenspiel mit Signalen aus dem umliegenden Gewebe nach Transplantation eine optimale Funktion der Pigmentepithelzellen erreicht wird.

Eine vergleichende Genexpressionsstudie von humanen RPE und IPE Zellen kommt zu der Schlussfolgerung, dass IPE Zellen im Genprofil zu sehr von RPE Zellen abweichen, um diese in Transplantationen ersetzen zu können [Cai *et al.*, 2006]. Die Autoren schließen aber nicht aus, dass nach einer Implantation die Umgebung des subretinalen Raums die Zellen derart prägt, dass sie ihre Genexpression zu RPE eigenen Merkmalen hin ändern können.

Gerade die IPE Zellen zeigen in der vorliegenden Studie im Vergleich zu RPE Zellen insgesamt

eine geringere Streuung zwischen den einzenen Kulturen und auf den meisten Materialien eine erhöhte Expression von RPE charakteristischen Genen wie RPE65, CRALBP und ZO-1. Somit adaptieren sie in Kultur den Phänotyp von RPE Zellen und sind durchaus potentielle Kandidaten für eine Transplantation bei degenerativen Erkrankungen des retinalen Pigmentepithels. Vor allem die deutliche Hochregulation des anti-angiogenen Faktors PEDF in IPE Zellen auf allen Materialien wäre bei einer Behandlung der feuchten Form der AMD von Vorteil.

4.5 Biokompatibilität der Materialien *in vivo*

4.5.1 Klinische Kontrollen subkonjunktival transplantierter Biomaterialien

Die klinischen Kontrollen verdeutlichen, dass Kollagen und Amnion weniger offensichtliche Entzündungen nach subkonjunktivaler Transplantation hervorrufen als Seidenmembranen und PLLA Vliese. Eine erste Entzündungsreaktion kann allein durch die Implantationsprozedur ausgelöst werden, die eine Verletzung verursacht und mit Vaskularisation und Gefäßdilatation beantwortet wird [Bernatchez *et al.*, 1994]. Diese tritt nur nach Implantation von Seide und PLLA auf, so dass die Implantation unter die Bindehaut nicht generell als invasive Methode einzustufen ist.

Bei Seide und Amnion gibt es Hinweise, dass die temporale Lokalisation der Membran im Vergleich zur superioren Position eine Entzündung begünstigt. Jedoch sind die Unterschiede nicht eindeutig und treten bei Kollagen und PLLA nicht auf. Wahrscheinlich ist die superiore Lage unterhalb des oberen Lides besser geschützt vor Reibung, temporal gelegene Implantate werden unter Umständen durch den Lidschlag eher gereizt. Liegt das Biomaterial im nasalen Quadranten, so ist eine Gewebereaktion aufgrund der Reibung der Nickhaut in der Literatur beschrieben [Ti *et al.*, 2002].

Kollagenmembranen neuerer Fertigungsauflagen demonstrieren schon klinisch eine schnelle Degradation innerhalb der mittleren Nachbeobachtungszeit. In der Zellkultur erweisen sich diese nach zwei Wochen als leicht gequollen. Offenbar führt diese Eigenschaft zu einer aufgelockerten Kollagenstruktur, so dass die Zellen nach Transplantation das Material leichter bearbeiten und abbauen können.

Klinische Kontrollen nach subkonjunktivaler Transplantation von Polyorthoester (POE) beschreiben in den ersten zehn Tagen eine starke Hyperämie, die sich in Gefäßneubildung und Schwellung der Bindehaut (Chemosis) ausdrückt [Zignani *et al.*, 1998]. Ähnliches wird für die Implantate aus Seide und PLLA beobachtet. Auffällig ist, dass γ-sterilisierte POE eine stärkere Reaktion hervorrufen als aseptisch hergestellte Polymere. In der Literatur wird angedeutet, dass eine γ-Sterilisation die enzymatische Degradation von Polymeren erleichtert [Chu and Williams, 1983]. Die so erhöhte Rate an Abbauprodukten könnte eine stärkere Inflammation provozieren. Als einziges Material in der *in vivo* Studie sind Seidenmembranen γ-sterilisiert. Möglicherweise lassen sich diese durch eine alternative Sterilisationsmethode biokompatibler machen.

4.5.2 Die histologische Evaluierung der Biomaterialien verdeutlicht Unterschiede in ihrer Gewebeverträglichkeit

In der histologischen Beurteilung erweist sich Kollagen als reizarm und geht mit den wenigsten Zell- oder Gewebereaktionen einher. In der gesamten Nachbeobachtung entsteht kaum eine Entzündung, aber auch wenig Vaskularisation oder Granulationsgewebe. Das Material wird sofort als eigen angenommen und ermöglicht eine überdurchschnittlich gute Verträglichkeit im umliegenden Gewebe. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse nach subkonjunktivaler Implantation

und der vielfachen klinischen Anwendung ist die equine Kollagenmembran auch zur subretinalen Transplantation bestens geeignet.

Dass Kollagen generell eine gute Biokompatibilität besitzt, zeigen neben anderen Publikationen auch subkonjunktivale Implantationen einer porösen Matrix, bestehend aus einem Kollagen-Chondroitinsufat Kopolymer, im Kaninchenmodell [Chen *et al.*, 2006], [Hsu *et al.*, 2000]. Das Material löst eine akute Entzündung 3-7 Tage nach Implantation aus, die sich nach zwei Wochen vollständig rückläufig zeigt. Eine Akkumulation von Lymphozyten oder Plasmazellen liegt zu keiner Zeit vor. Das Material degradiert schon nach vier Wochen, jedoch ist aufgrund der porösen Struktur eine Zellinfiltration möglich, die einen schnellen Abbau begünstigt.

Ähnlich zu den hier beschriebenen Ergebnissen für Kollagen, nämlich das einzelne Auftreten von Entzündungszellen im mittleren Verlauf, zeigten Zhao *et al.* nach subkutaner Transplantation im Rattenmodell eine milde Kapselbildung und zelluläre Reaktion bis zu drei Wochen der Nachbeobachtung [Zhao *et al.*, 2000]. Eine längere Erfassung der Materialverträglichkeit findet hier jedoch nicht statt.

Ebenfalls subkutan wird eine gute Biokompatibilität von porcinen oder bovinen Kollagenmembranen beschrieben [Rothamel *et al.*, 2005]. Zum Teil kommt es hier, im Gegensatz zum equinen Kollagen der vorliegenden Studie, in der Histologie zu einer Fremdkörperreaktion mit Riesenzellen; insgesamt ist jedoch nur wenig inflammatorische Reaktion zu beobachten. Chemisch oder enzymatisch quervernetzte Membranen zeigen Unterschiede zu nicht quervernetzten Kollagenen auf, wie eine verlängerte Degradationszeit, verringerte Vaskularisation und Gewebeintegration. Die Degradation der von Rothamel *et al.* verwendeten nicht quervernetzten Kollagene verläuft innerhalb von 16 Wochen. Dies liegt im gleichen Zeitrahmen wie der Abbau zwischen 10 und 16 Wochen für das in der vorliegenden Studie untersuchte equine Kollagen. Polypeptide, wozu auch Kollagen zählt, werden langsam über eine enzymatische Degradation abgebaut [Zhao *et al.*, 2000], so dass die Zellen die entstehenden Produkte naturgemäß verstoffwechseln und integrieren können.

Auch humane Amnionmembranen zeigen eine gute Biokompatibilität nach subkonjunktivaler Transplantation. Im Vergleich zu Kollagen wird Amnion als Fremdkörper erkannt und ruft eine milde Entzündung hervor. Die Zellen reagieren außerdem mit einer leichten Einkapselung der Membran. Jedes nicht-autologe Biomaterial löst ein gewisses Maß an Fremdkörperreaktion nach einer Implantation *in vivo* aus [Altman *et al.*, 2003], so dass diese erste Reaktion natürlich ist. Im Verlauf wird die Kapsel von Granulationsgewebe mit vielen Gefäßen und Bindegewebszellen ersetzt und die Folie abgebaut. Die frühe Ausbildung von Granulationsgewebe schon nach einer Woche weist auf eine schnelle Integration des Materials in das umliegende Gewebe hin.

Amnionmembranen finden weit verbreitet klinische Anwendung in der okulären Oberflächenrekonstruktion, bei der sich das Material als bioverträglich erweist und keine Immunreaktionen hervorruft [Gomes *et al.*, 2005], [Tseng *et al.*, 1997]. Darüber hinaus besitzt Amnion antiinflammatorische, anti-mikrobielle und anti-virale Eigenschaften und wird deshalb auch als Verband bei Wunden und Verbrennungen eingesetzt [Levis and Daniels, 2009], [Seo *et al.*, 2002]. Eine weitere Applikation in der subretinalen Transplantation ist bezüglich des Kriteriums der Bioverträglichkeit zu befürworten. Die beobachtete milde Inflammation könnte auf die xenogene Transplantation humanen Materials in das Kaninchenauge zurückzuführen sein, wie auch bei Barton und Mitarbeitern in größerem Ausmaß nach Filtrationschirurgie beobachtet wurde [Barton *et al.*, 2001]. Am Patienten sollte dieses Risiko aufgrund der allogenen Transplantation noch reduzierter sein.

Die Degradation der Amnionmembran ist nach 14 Wochen vollzogen. Korrespondierende Ergebnisse publizierten Sekiyama *et al.* insofern, als dass Amnion nach Entfernung der Konjunktiva und Transplantation auf die Sklera nach mindestens 12 Wochen noch in klinischen Kontrollen nachgewiesen wird [Sekiyama *et al.*, 2007]. Da Amnion zu großen Teilen aus Kollagen

und Glykoproteinen wie Laminin besteht, findet wie bei der Kollagenmembran ein enzymatischer Abbau in einem ähnlichen Zeitrahmen statt.

Die Histologie der Seidenimplantate bestätigt die in der klinischen Kontrolle sichtbaren Entzündungszeichen vor allem im mittleren Verlauf und deren Minderung im Langzeitverlauf. Auf histologischer Ebene zeigt sich im Vergleich zu Kollagen und Amnion eine andauernde Zellreaktion bis zur Degradation der Membran und damit eine leichte, aber chronische Entzündung. Nicht nur die hohe Anzahl an Entzündungszellen, sondern auch Gewebereaktionen wie Kapselbildung, Blutungen und einmalig auftretende Nekrose sprechen gegen eine gute Verträglichkeit des Materials. Allerdings wird wie bei Amnion schon ab dem Kurzzeitverlauf ein durchblutetes Granulationsgewebe beobachtet, welches sich im Langzeitverlauf teilweise in neues Bindegebe umstrukturiert.

Seide wird im Bereich der Cornearekonstruktion von verschiedenen Arbeitsgruppen als Alternative zur Amnionmembran untersucht [Levis and Daniels, 2009]. Hier werden für Seide nicht-immunogene Eigenschaften *in vivo* beschrieben. Meinel und Mitarbeiter vergleichen die Verträglichkeit von Membranen aus Seide mit Kollagen und Polylactid als Substrat für mesenchymale Stammzellen mittels intramuskulärer Transplantation [Meinel *et al.*, 2005]. In der Nachbeobachtungszeit von sechs Wochen zeigt sich wenig inflammatorische Reaktion um Seide und Kollagen, aber eine granulomatöse Entzündung um Polylactid (PLA) Implantate. Zwar bildet sich um Seide eine Kapsel, aber die Zahl der Entzündungszellen ist geringer und rückläufig im Gegensatz zu Kollagenmembranen. Die Reaktion um PLA Implantate ist am stärksten. Meinel *et al.* folgern abschließend, dass Seide gleich oder besser biokompatibel im Vergleich zu Kollagen ist. Dies steht im Gegensatz zu den hier beobachteten Histologien. Andererseits treffen die Autoren auch die Aussage, dass die Reaktion auf Kollagen stärker zu sein scheint als sonst in der Literatur beschrieben.

Die Dicke der Seidenmembran stellt sich in den histologischen Schnitten größer dar als in der Messung des nativen Materials (vgl. Tabelle 3.11 und Kapitel 3.1.3). Hier scheint die Ursache eher der schräge Schnittwinkel der Gewebeproben als quellende Eigenschaften des Biomaterials zu sein, denn ein Quellen der Seidenmembran wurde *in vitro* nicht festgestellt.

Das Degradationsverhalten von Seide allgemein ist langsam und erfolgt proteolytisch [Altman *et al.*, 2003]. Im Rattenmodell zeigt sich, dass Seide als Nahtmaterial subkutan nach 10 Wochen 83% seiner Zugfestigkeit verliert [Altman *et al.*, 2003]. Auch Meinel *et al.* beobachten intramuskulär keinen Abbau der Seide innerhalb der Nachbeobachtung von sechs Wochen. Eine vollständige Degradation nach 13 Wochen wie in dieser Arbeit beobachtet liegt folglich im zu erwartenden Zeitfenster.

PLLA zeigt aufgrund der Histologie eine schlechtere Biokompatibilität als alle anderen Materialien. Die anfangs starke inflammatorische Reaktion ist charakeristisch für hydrophobe Polymere. Nach subkonjunktivaler Transplantation von Polyorthoester (POE) als *drug release* System ergibt sich nach drei Tagen eine starke Inflammation und in der Histologie eine Reaktion aus Eosinophilen und Lymphozyten [Bernatchez *et al.*, 1994]. Dies entspricht den hier dargestellten Ergebnissen für PLLA in der ersten Woche. Im Gegesatz zu PLLA degradiert das POE vollständig innerhalb von drei Wochen ohne chronische Entzündung oder eine Einkapselung des Materials.

Um PLLA Nanofasern ist die akute Entzündung schneller rückläufig als bei Seide, was zunächst auf eine bessere Verträglichkeit des PLLA rückschließen lässt. Zudem bildet sich schon im frühen und mittleren Verlauf ein Granulationsgewebe aus, das bis zur Degradation bestehen bleibt. Kopolymere bestehend aus Polyglykolsäure und Polylactid weisen ebenfalls eine frühe Fremdkörperreaktion nach subkutaner Implantation auf [Zhao *et al.*, 2000]. Wie das PLLA ist im frühen Verlauf das Kopolymer schon fragmentiert, Granulationsgewebe vorhanden und innerhalb von drei Wochen nach Implantation von einer Kapsel umgeben.

Im späten Verlauf besteht die zelluläre Reaktion jedoch aus den höchsten Anzahlen von

Makrophagen und Lymphozyten der gesamten Studie. Diese beiden Zelltypen sind charakteristisch für eine chronische granulomatöse Entzündung [Böcker, 2008]. Riesenzellen sind nicht zwangsläufig an einer solchen Entzündung beteiligt und sind auch um PLLA kaum vorhanden.

Chronische granulomatöse Entzündungen werden oft über Abbauprodukte ausgelöst. So beschreiben Zhao *et al.*, dass Polyester durch Hydrolyse der Esterverbindungen degradieren. Dadurch kommt es zum massiven Freiwerden von monomeren Carbonsäuren, die zur Inflammation im Gewebe beitragen [Zhao *et al.*, 2000]. Eine Spaltung von PLLA Polymeren erfolgt nach der gleichen Reaktion. Dadurch, dass Wasser an vielen Esterbindungen gleichzeitig angreift, wird auch hier wahrscheinlich das Abbauprodukt Milchsäure schlagartig freigesetzt und führt zu einer chronischen Entzündung. Das Polymer ist folglich nach einer akuten Reaktion während der Kurzzeitbeobachtung grundsätzlich biokompatibel, wie auch der deutliche Rückgang der Anzahl der Entzündungszellen im mittleren Verlauf zeigte. Erst mit beginnender Degradation des Polymers bringen die Zerfallsprodukte eine Unverträglichkeit im Gewebe mit sich.

Diese Annahme stimmt auch mit Erfahrungen von Sundback *et al.* überein. Polymere aus PLGA (Polylactid-co-Glycolid) lösen nach intramuskulärer Implantation frühe Entzündung mit Makrophagen, Lymphozyten und leichter Fibrose aus. Wie auch bei PLLA sind hier keine neutrophilen Granulozyten beteiligt. Im Verlauf manifestiert sich eine chronische Entzündung mit deutlichem Anstieg der Lymphozyten- und Makrophagenzahl und Vorkommen von Riesenzellen. Dies korrespondiert zeitlich mit einem rapiden Massenverlust des PLGA, welches erst anschwillt und dann in kurzer Zeit abgebaut wird, anstelle einer langsamen aber stetigen Materialresorption. Die chronische Entzündung wird folglich durch das Degradationsverhalten des Polymers ausgelöst [Sundback *et al.*, 2005]. Sundback schildert darüber hinaus zeitgleich zur chronischen Entzündung eine Verdickung der Fibrose um die Implantate. Eine persistierende Kapsel vor allem um feste Anteile des PLLA zeigt sich auch in der vorliegenden Studie. Dies verdeutlicht, dass das Material auch nach vielen Wochen noch als Fremdkörper erkannt wird.

4.5.3 Schlussfolgerung

Allein durch den Implantationsvorgang kann es aufgrund von Verletzung des Gewebes zu einer lokalen Enzündung kommen. Diese inflammatorische Reaktion des Gewebes auf ein fremdes Material ist der Versuch, es zu isolieren [Bernatchez *et al.*, 1994], [Zhao *et al.*, 2000], [Zignani *et al.*, 1998]. Akute Entzündungen oder auch kleine Blutungen in der Histologie wenige Tage nach der Transplantation sind demnach charakteristische Ereignisse und zunächst kein Ausschlusskriterium für eine Bioverträglichkeit eines Materials. Kommen Hämorrhagien noch im Langzeitverlauf gehäuft vor, wie es bei Seidenmembranen und PLLA Vliesen beobachtet wurde, könnte eine erhöhte vaskuläre Permeabilität als Reaktion auf die andauernde Entzündung die Ursache sein [Gelatt, 2007].

Grundsätzlich ist eine Zelladhäsion und -infiltration sowie der Grad der Fremdkörperreaktion abhängig von den Eigenschaften der Transplantate wie deren Größe, Geometrie oder Oberfläche [Ayyala *et al.*, 2000]. Die Implantationsstelle beeinflusst ebenfalls die Ausprägung einer Abwehrreaktion auf ein Biomaterial [Altman *et al.*, 2003]. Da die Konjunktiva ein Gewebe mit starker Durchblutung ist, wird hier eine inflammatorische Reaktion schnell deutlich. In dieser Umgebung beweisen sowohl Kollagen als auch Amnion eine sehr gute Verträglichkeit und sind folglich definitiv geeignet als Biomaterial zur Transplantation *in vivo*.

Im Vergleich zur Konjunktiva weist der subretinale Raum einen verlangsamten Metabolismus auf und ist darüberhinaus ein immunprivilegierter Bereich [Zamiri *et al.*, 2007]. Folglich sind weniger Entzündungsreaktionen nach einer subretinalen Implantation der Materialien zu erwarten. Auch weniger biokompatible Membranen wie Seide können daher durchaus eine Anwendung als Substrat für Zelltransplantation finden.

Aufgrund vieler Hinweise auf gewebeschädigende Zerfallsprodukte von PLLA bedeutet dies,

dass die Nanofasern langfristig nicht vertragen werden. Zusammen mit den zahlreichen Publikationen über verminderte Biokompatibilität bleibt offen, ob nach subretinaler Transplantation diese Defizite toleriert oder ausgeglichen würden.

4.5.4 Biomaterialien werden im subretinalen Raum toleriert

Basierend auf den positiven Ergebnissen für Kollagen- und Amnionmembranen werden diese auch subretinal transplantiert. Die Implantation ist chirurgisch machbar und beide Materialien fügen sich ohne generelle Komplikationen in den subretinalen Raum ein. Die Histologie beweist, dass beide Biomaterialien keinerlei inflammatorische Reaktion auslösen (vgl. Kapitel 3.8).

Analog zu den vorgestellten Ergebnissen ist Kollagen in der Literatur bereits als Transplantat für den subretialen Raum bestätigt. Die Retina wird nur an der Implantationsstelle der Membran durch die Retinotomie geschädigt, zeigt distal aber eine normale Morphologie [Bhatt *et al.*, 1994]. Auch für Amnionmembranen nach Transplantation wird in der Literatur eine entzündungsfreie Situation geschildert [Ohno-Matsui *et al.*, 2006]. Gleiches gilt für andere Materialien wie verschiedene Polyimide, die zur Fertigung von retinalen Prothesen dienen [Montezuma *et al.*, 2006]. Die Histologie nach drei Monaten zeigt für alle gestesteten Materialien keine Inflammation oder Hämorrhagie.

Die Erklärung für die gute Verträglichkeit liegt im Immunprivileg des subretinalen Raums. Nicht-körpereigene Materialien werden durch verschiedene Mechanismen der RPE Zellen und anderer okulärer Gewebe toleriert ohne eine Fremdkörperreaktion auszulösen [Giordano *et al.*, 1997], [Jiang *et al.*, 1993], [Zamiri *et al.*, 2007].

In Untersuchungen von Substraten mit RPE Zellmonoschichten, wie die anteriore Linsenkapsel oder Gelatinefolien, werden diese Zell*sheets* subretinal gut toleriert [Del Priore *et al.*, 2004], [Nicolini *et al.*, 2000]. Bei diesen Materialien tritt jedoch das Problem der Positionierung des Implantates auf. Beide Arbeitsgruppen berichten, dass sich die Biomaterialien mehrfach aufrollen oder falten. Auch Ohno-Matsui gibt an, dass die Amnionmembran während der Implantation schwer zu handhaben ist, was in operativen Komplikationen wie Einblutungen und Netzhautablösungen resultiert [Ohno-Matsui *et al.*, 2006]. Diese Erfahrung wird für Amnion in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Bei Kollagenmembranen treten solche Komplikationen aufgrund der erschwerten Handhabung einzelner Fertigungsauflagen jedoch auf und sind eindeutig auf die Materialeigenschaften zurückzuführen.

Ein essentieller Faktor im Bereich der subretinalen Transplantation ist die Dicke des verwendeten Materials. Neeley *et al.* verwenden Polyglycerolsebacat als Gerüst für retinale Vorläuferzellen, welches sich mit einer Dicke von 45 µm den Gegebenheiten des subretinalen Spaltes anpasst [Neeley *et al.*, 2008]. Sowohl Kollagen als auch Amnion werden in der vorliegenden Arbeit in einer Dimension dünner als 15 µm eingesetzt. Damit werden beide Membranen den Anforderungen einer minimalinvasiven Implantationsprozedur in jedem Fall gerecht.

Ultradünne Kollagenfilme in der Dimension der Bruch'schen Membran von $2,4$ µm produziert die Arbeitsgruppe um Lu auf einem Teflonuntergrund [Lu *et al.*, 2007]. Ob die Folien nach Ablösen vom Untergrund stabil genug für eine Handhabung und Transplantation sind, bleibt in der Publikation jedoch offen.

Ein anderer Aspekt die Dimension betreffend ist die Permeabilität des implantierten Materials. Bildet ein Material eine undurchlässige Barriere zwischen RPE Zellen und Choroidea wird die Versorgung der Zellen und folglich der Retina unterbunden. Ohno-Matsui diskutiert zu Amnion einer Dicke von 37 µm, dass die Membran zu dick sei, um ausreichend Diffusion durch diese zu ermöglichen [Ohno-Matsui *et al.*, 2006]. Auch in den Permeabilitätsmessungen der vorliegenden Arbeit zeigt die Amnionmembran einen niedrigeren Diffusionskoeffizient als Kollagen und PLLA. Da eine deutlich geringere Materialdicke von 7 µm für Amnion ermittelt wurde, sollten sich jedoch keine Hindernisse in der Versorgung durch das Biomaterial hindurch

ergeben. Kollagenmembranen erlauben trotz größerer Materialdicke mehr Diffusion als Amnion, so dass auch sie einen ausreichenden Nährstofftransport gewährleisten.

Die Choroidea unterhalb des Kollagens ist bis zu 38 Wochen mit vielen Blutgefäßen durchsetzt und zeigt eine natürliche Morphologie. Da publiziert ist, dass die Choriokapillaris atrophiert, wenn RPE Zellen degenerieren, kann demzufolge das RPE in der vorliegenden Studie durch das Transplantat nur minimal beeinträchtigt worden sein [Majji *et al.*, 1999]. Eine kleine lokale RPE Atrophie unterhalb der Amnion- und Kollagenimplantate ist wahrscheinlich auf eine mechanische Schädigung des Pigmentepithels durch den Implantationsvorgang zurückzuführen.

Im Langzeitverlauf nach Transplantation stellt sich erwartungsgemäß eine retinale Degeneration ein. Das Biomaterial allein fungiert wie eine Barriere, die eine Verbindung von RPE zur Retina in diesem Bereich verhindert. Transplantierte man die Membran als Substrat zusammen mit einem konfluenten Zellrasen an RPE oder IPE Zellen, so wären diese in der Lage, Kontakt zu Photorezeptoren aufzunehmen und den wechselseitigen Metabolismus aufrecht zu erhalten. Aufgrund der Zellaktivität ist außerdem zu erwarten, dass das Material schneller degradiert und eine hinreichende Diffusion von Nährstoffen aus der Choroidea bestehen bleibt.

Auf eine Transplantation mit Pigmentepithelzellen wird in dieser Untersuchung verzichtet, um eine mögliche xenogene Immunantwort zu vemeiden, wie Rezai *et al.* sie nach Transplantation von PLG Filmen mit humanen fetalen RPE Zellen trotz des Immunprivileges im subretinalen Spalt beobachtet [Rezai *et al.*, 2000].

Zusammenfassend bewerkstelligen Kollagen und Amnion die prinzipiellen Anforderungen an ein Biomaterial, das eine erfolgreiche Transplantation in den subretinalen Raum gewährleisten muss ohne das umliegende Gewebe zu beeinträchtigen. Die Kollagenmembranen müssen seitens des Herstellers nochmals optimiert werden, damit sie ihre ursprünglichen Eigenschaften, wie in der Zellkultur und anfangs auch *in vivo* beobachtet, vollständig und reproduzierbar wiedererlangen.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die unterschiedlichen experimentellen Untersuchungen zeigen, dass sich jedes der Biomaterialien durch vorteilhafte und nachteilige Eigenschaften kennzeichnet, die eine Gesamtbewertung ermöglichen.

Die Kollagenmembranen equinen Ursprungs zeichnen sich in allen untersuchten Aspekten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als geeignetes Trägermaterial für Pigmentepithelzellen aus. Die ursprünglich verwendeten Fertigungsauflagen lassen sich optimal handhaben und fördern ein konfluentes Zellwachstum und differenzierte Charakteristiken der Zellen auf Gen- und Proteinebene. Die Bioverträglicheit des Materials ist exzellent und im Vergleich der vier Materialien am besten. Die subretinale Implantation der Membran ist chirurgisch durchführbar und das Material zeigt keine störenden Einflüsse auf die Anatomie des umliegenden Gewebes. Schwierigkeiten ergeben sich in der qualitativen Reproduktion der Materialfertigung seitens des Herstellers. Im Zuge einer potentiellen klinischen Anwendung muss diese Reproduzierbarkeit zweifellos gewährleistet sein.

Amnionmembranen erweisen sich im Rahmen der *in vivo* Studie ebenfalls als sehr gewebevertägliches Material und ermöglichen eine komplikationslose subretinale Transplantation. Die Anzeichen einer schnelleren Degradation als Kollagen im subretinalen Raum und keinerlei Schwierigkeiten mit Membranen unterschiedlicher Spenderinnen, machen auch Amnion zu einem sehr potentiellen Trägermaterial. Auch in der Handhabung und Zellkultur beweist Amnion ausreichende Eigenschaften als Substrat zur Entstehung differenzierter Zellverbände. Nachteilig für einen potentiellen Einsatz als Transplantat ist die limitierte Verfügbarkeit des humanen Materials.

Die Materialien aus Seide und PLLA werden aufgrund von Defiziten in der Handhabung oder Zellkultur im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur subretinalen Transplantation eingesetzt. Dies verdeutlicht, dass ein Optimierungsbedarf besteht, um einen potentiellen Einsatz der Biomaterialien zu befürworten.

Seidenmembranen sind hinsichtlich verschiedener Aspekte weniger geeignet als Trägermaterial für RPE und IPE Zellen. Die Oberfläche übt nachteilige Einflüsse auf Pigmentepithelzellen aus, die auf Proteinebene anhand von Stressfasern und auf der Genebene durch die außerordentlich hohe Expression des CD86 Gens deutlich werden und zudem ein konfluentes Zellwachstum einschränken. Dennoch erlaubt Seide in Arealen das Wachstum von Zellen und deren RPE charakteristische Differenzierung. Modifizierungen der Oberfläche, wie beispielsweise das Anfügen von RGD Tripeptiden könnte die Eigenschaften der Seide verbessern, denn diese Aminosäuren dienen als spezifische Erkennungssequenz für Zellen und unterstützen die Adhäsion und Proliferation [Meinel *et al.*, 2005], [Minoura *et al.*, 1995]. In der *in vivo* Studie wird durch das Biomaterial eine inflammatorische Reaktion ausgelöst, die im Zuge einer potentiellen Anwendung an Patienten reduziert werden muss. Eine andere Sterilisationstechnik anstelle der γ-Sterilisation könnte unter Umständen die immunogene Wirkung der Seide vermindern [Chu and Williams, 1983].

PLLA zeigt die beste Diffusionseigenschaft in der Größenordnung von natürlichen Gewebekomplexen und garantiert somit einen ausreichenden Nährstoffstrom zwischen Choroidea und RPE. Eben diese Struktur erschwert dagegen das Zellwachstum zu konfluenten Monoschichten und ermöglicht keine Bildung einer wasserdichten Barriere durch *tight junctions*. Die morphologischen Einschränkungen bestätigen sich auf der Ebene der Genexpression. Eine plane Transplantation wie bei den Membranen ist aufgrund der fragilen Faserstruktur nicht möglich; zudem löst das Biomaterial durch seine sauren Abbauprodukte *in vivo* chronische Entzündungen aus. Als Trägermaterial für Pigmentepithelzellen zur subretinalen Transplantation sind die PLLA Faservliese folglich in dieser Form nicht geeignet.

Optimierungen des Biomaterials sind jedoch denkbar. So könnten die Randbedingungen während des Elektrospinnens so geändert werden, dass die Faserstruktur flächiger wird und das Vlies eher einer porösen Membran entspricht, um den Zellen mehr Adhäsionsfläche zu bieten. Beschichtungen der Fasern mit Proteinen der EZM sind ebenso möglich [Duan *et al.*, 2007]. Davon abgesehen ist das Abbauprodukt von PLLA, die Milchsäure, im subretinalen Raum ein reichlich vorhandenes Endprodukt des Stoffwechsels der Photorezeptoren und wird vom RPE zur Choroidea transportiert. Über Bicarbonat Transportsysteme ist das RPE in der Lage, auf Änderungen des pH-Wertes zu reagieren [Strauss, 2005]. Unter Umständen hätte die Degradation des PLLA Vlieses im subretinalen Raum keine so destruktiven Auswirkungen, da das RPE in der Lage wäre, den Säureüberschuss zu kompensieren.

Im Hinblick auf die untersuchten Zellarten des retinalen- bzw. Irispigmentepithels erweisen sich IPE Zellen definitiv als potentielle Kandidaten für den Zellersatz degenerierter RPE Zellen. IPE Zellen können erfolgreich kultiviert werden und bilden vitale und dichte Zellverbände. Ihre Genexpression bestätigt, dass sie, zum Teil mehr als RPE Zellen, die Expression essentieller Gene aufrechterhalten oder hoch regulieren. Außerdem macht ihre leichte Gewinnung aus dem Auge eines Patienten diese Zellen für eine klinischen Anwendung attraktiv.

In der Gesamtbetrachtung aller Kriterien ist sowohl das equine Kollagen als auch das humane Amnion als Trägermaterial für Pigmentepithelzellen herausragend gut geeignet und sollte zukünftig weiterhin untersucht werden. Funktionelle Tests wie die Phagozytoseleistung von Pigmentepithelzellen auf den beiden Biomaterialien sowie weiterführende Expressionsstudien zu RPE charakteristischen Genen können im Vergleich von RPE und IPE Zellen die Eignung des IPE als RPE Ersatz detailierter beurteilen. Letztlich werden Transplantationen allogener Zell*sheets* im Kaninchenmodell weitere Auskunft über die Biomaterialien und ihre Einflüsse auf Pigmentepithelzellen in der Umgebung des subretinalen Raumes geben.

Abbildungsverzeichnis

1.1 Aufbau des menschlichen Auges 2
1.2 Aufbau der Netzhaut 2
1.3 Aufbau der RPE Zellen 4
1.4 Seheindruck mit fortschreitender AMD 7
1.5 Schema zur Entwicklung eines Zell*sheets* 11

2.1 Die verwendeten Biomaterialien 18
2.2 Befestigung der Biomaterialien für die Zellkultur 25
2.3 Messaufbau zur Diffusionsmessung 30
2.4 Bildschirmfoto der *Software zur Bestimmung der Diffusion* 33
2.5 Präparation boviner Augen 35
2.6 TER: Fertigung der Biomaterial-*Inserts* und Messaufbau 38
2.7 Subkonjunktivale Transplantation 44
2.8 Subretinale Transplantation 45

3.1 Materialeigenschaften 50
3.2 Elektronenmikroskopie der Materialoberflächen 51
3.3 Benetzungseigenschaften der Biomaterialien 52
3.4 Eichreihe gemessener Extinktionen definierter BPB Lösungen 53
3.5 Diffusionskoeffizienten der Biomaterialien 54
3.6 Materialänderungen während der Verwendung *in vitro* 56
3.7 PKH26 Färbung von ARPE-19 Zellen 57
3.8 PKH26 Färbung boviner RPE Zellen 58
3.9 PKH26 Färbung boviner IPE Zellen 58
3.10 Kryoschnitte von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien 60
3.11 Kryoschnitte von primärem RPE auf Biomaterialien 60
3.12 Kryoschnitte von primärem IPE auf Biomaterialien 61
3.13 Morphologie des bovinen RPEs auf Biomaterialien im Kulturverlauf . . 62
3.14 Konfluentes Wachstum des bRPEs auf Biomaterialien 64
3.15 Morphologie des bovinen IPEs auf Biomaterialien im Kulturverlauf . . . 65
3.16 Konfluentes Wachstum des bIPEs auf Biomaterialien 66
3.17 Vitalfärbung von ARPE-19 Zellen auf Biomaterialien 67
3.18 Vitalfärbung von bovinen RPE Zellen auf Biomaterialien 69
3.19 Vitalfärbung von bovinen IPE Zellen auf Biomaterialien 71
3.20 Immunhistologie von ARPE-19 Zellen: Gene des Zytoskeletts 72
3.21 Immunhistologie von ARPE-19 Zellen: RPE65 und ZO-1 73
3.22 TER Messung: Balkendiagramm der Widerstandswerte 75

3.23 ZO-1 Färbung von ARPE-19 Zellen nach der TER Messung 76
3.24 bRPE Morphologie vor Isolation der Gesamt-RNA 78
3.25 bIPE Morphologie vor Isolation der Gesamt-RNA 79
3.26 Effizienzkontrollen der PCR 82
3.27 Graphische Datendarstellung der *LightCycler Software* 83
3.28 Genexpressionsanalyse der bRPE Zellen nach Kultur auf Biomaterialien 88
3.29 Genexpressionsanalyse der bIPE Zellen nach Kultur auf Biomaterialien . 89
3.30 Klinische Kontrollen nach subkonjunktivaler Transplantation 92
3.31 Anzahl der Entzündungszellen nach subkonjunktivaler Transplantation . 95
3.32 Histologie von Kollagenfolien nach subkonjunktivaler Transplantation . 96
3.33 Histologie von Amnionmembranen nach subkonjunktivaler Transplantation 97
3.34 Histologie von Seidenmembranen nach subkonjunktivaler Transplantation 98
3.35 Histologie von PLLA Vliesen nach subkonjunktivaler Transplantation . 99
3.36 Degradation subkonjunktival transplantierter Biomaterialien 100
3.37 Ersatzgewebebildung um Biomaterialien nach subkonjunktivaler Transplantation 103
3.38 Klinische Kontrolle und Makroskopie nach subretinaler Transplantation 106
3.39 Histologie von Kollagen und Amnion nach subretinaler Transplantation 107

Tabellenverzeichnis

2.13 Konzentrationen von BPB Lösungen zur Erstellung einer Eichgeraden . 31

3.1 Benetzbarkeit der Folien 52
3.2 Diffusionskoeffizienten der Biomaterialien für eine BPB Lösung 54
3.3 TER Messung: Widerstandswerte 75
3.4 RNA Konzentrationen nach Isolation der Gesamt-RNA 80
3.5 Intra-Präzisionskontrolle der PCR 81
3.6 Effizienzkontrolle der PCR: CP Werte 81
3.7 Einteilung der Genexpression in Kategorien anhand der CP Werte . . . 84
3.8 Wertetabelle der $\Delta\Delta$ *CT* Berechnung für bRPE Zellen 86
3.9 Wertetabelle der $\Delta\Delta$ *CT* Berechnung für bIPE Zellen 87
3.10 Gesamtzahl der Entzündungszellen nach subkonjunktivaler Transplantation 94
3.11 Dicke der subkonjunktival implantierten Materialien 101

A.1 Benetzungseigenschaften 133
A.2 Diffusionsmessungen 134
A.3 Extinktionen von BPB Lösungen zur Erstellung der Eichgeraden 134
A.4 Dickenmessung der Materialien 135
A.5 TER Messungen 136
A.6 *Crossing Points*: bRPE, HPRT1 137
A.7 *Crossing Points*: bIPE, HPRT1 138
A.8 *Crossing Points*: bRPE und IPE, HPRT1 139
A.9 *Crossing Points*: RPE65 140
A.10 *Crossing Points*: CRALBP 141
A.11 *Crossing Points*: CD86 142
A.12 *Crossing Points*: VEGF 143
A.13 *Crossing Points*: PEDF 144
A.14 *Crossing Points*: Cathepsin D 145
A.15 *Crossing Points*: ZO-1 146
A.16 *Crossing Points*: Keratin 8 147
A.17 Entzündungszellen: Kollagen Kurzzeitverlauf 148
A.18 Entzündungszellen: Kollagen mittlerer Verlauf 149
A.19 Entzündungszellen: Kollagen Langzeitverlauf 150
A.20 Entzündungszellen: Amnion Kurzzeitverlauf 151
A.21 Entzündungszellen: Amnion mittlerer Verlauf 152

A.22 Entzündungszellen: Amnion Langzeitverlauf 153
A.23 Entzündungszellen: Seide Kurzzeitverlauf 154
A.24 Entzündungszellen: Seide mittlerer Verlauf 155
A.25 Entzündungszellen: Seide Langzeitverlauf 156
A.26 Entzündungszellen: PLLA Kurzzeitverlauf 157
A.27 Entzündungszellen: PLLA mittlerer Verlauf 158
A.28 Entzündungszellen: PLLA Langzeitverlauf 159

Anhang A

Originale Messdaten

A.1 Hydrophilie der Materialoberflächen

Tabelle A.1: Ermittelte Kontaktfläche eines Wassertropfens auf den trockenen Materialien.

		Fläche [cm^2]	
Material	**Messung**	nach 20 s	nach 80 s
Kollagen	1	4,75	4,92
	2	4,45	4,64
	3	5,13	5,42
	4	4,74	5,01
	5	4,58	5,02
	6	4,81	5,24
Amnion	1	6,14	5,89
	2	5,81	5,92
	3	6,78	6,76
	4	6,95	7,01
	5	5,20	5,15
	6	6,85	6,87
Seide	1	5,58	5,96
	2	6,00	6,44
	3	5,84	5,98
	4	6,64	6,77
	5	6,54	6,62
	6	6,45	6,72
PLLA	1	3,46	3,31
	2	3,47	3,44
	3	3,58	3,28
	4	3,28	3,23
	5	3,44	3,39
	6	3,45	3,39

A.2 Diffusionsmessungen

Tabelle A.2: Diffusionskoeffizienten und Zeitpunkte, an denen 50% bzw. 95% Konzentrationsausgleich vorliegt. Aufgeführt sind je Material drei unabhängige Diffusionsläufe.

Material	**Dicke [µm]**	**D [cm²/s]**	**$T_{50\%}$ [h]**	**$T_{95\%}$ [h]**
Kollagen 1	15	$9{,}79\times10^{-8}$	7,38	31,88
Kollagen 2	15	$7{,}72\times10^{-8}$	9,35	40,42
Kollagen 3	15	$1{,}09\times10^{-7}$	6,63	28,65
Anmion 1	7	$7{,}79\times10^{-8}$	4,65	20,09
Anmion 2	7	$7{,}25\times10^{-8}$	4,65	20,09
Anmion 3	7	$5{,}38\times10^{-8}$	4,02	27,00
Seide 1	15	$6{,}59\times10^{-8}$	9,67	41,77
Seide 2	10	$2{,}92\times10^{-8}$	16,49	71,25
Seide 3	15	$1{,}13\times10^{-7}$	6,39	27,60
PLLA 1	15	$2{,}15\times10^{-7}$	3,35	14,50
PLLA 2	15	$1{,}54\times10^{-7}$	4,69	20,25
PLLA 3	15	$1{,}24\times10^{-7}$	5,83	25,17
bovineBM-CH 1	100	$6{,}71\times10^{-7}$	7,17	31,01
bovineBM-CH 2	92	$3{,}46\times10^{-7}$	12,84	55,51
bovineBM-CH 3	95	$4{,}81\times10^{-7}$	9,50	41,05
humane BM-CH 1	35	$3{,}23\times10^{-7}$	5,21	22,54
humane BM-CH 2	35	$2{,}73\times10^{-7}$	6,17	26,65
humane BM-CH 3	35	$2{,}83\times10^{-7}$	5,95	25,72

A.2.1 Eichwerte zur Erstellung der Regressionsgeraden

Tabelle A.3: Gemessene Extinktionen bezogen auf bekannte Konzentrationen von BPB-Lösungen zur Erstellung der Eichgeraden.

Konzentration [mol/l]	**Kammer 1 [BPB]**	**Kammer 2 [PBS]**
$0,00$	0,00	0,01
$2,50\times10^{-7}$	0,01	0,01
$5,00\times10^{-7}$	0,02	0,01
$1,00\times10^{-6}$	0,03	0,03
$1,68\times10^{-6}$	0,07	0,05
$3,20\times10^{-6}$	0,13	0,10
$5,00\times10^{-6}$	0,19	0,16
$6,60\times10^{-6}$	0,23	0,21
$8,36\times10^{-6}$	0,28	0,25
$1,00\times10^{-5}$	0,31	0,28
$1,16\times10^{-5}$	0,36	0,32
$1,30\times10^{-5}$	0,39	0,35

A.2.2 Dickenmessung der Materialien

Tabelle A.4: Dickenmessung der Materialien, die für Diffusionsmessungen verwendet werden (SD $\widehat{=}$ Standardabweichung).

		Probenstück Dicke [µm]		
Material	**Messung**	**1**	**2**	**3**
Kollagen	1	21,00	18,00	17,00
	2	17,00	16,00	15,00
	3	16,00	16,00	14,00
	4	16,00	16,00	12,00
	5	15,00	15,00	10,00
	6	15,00	10,00	8,00
	Mittelwert	16,67	15,17	12,67
	SD	2,25	2,71	3,33
Amnion	1	13,00	5,00	11,00
	2	11,00	5,00	8,00
	3	8,00	5,00	8,00
	4	7,00	5,00	7,00
	5	7,00	4,00	7,00
	6	6,00	3,00	6,00
	Mittelwert	8,67	4,50	7,83
	SD	2,73	0,84	1,72
Seide	1	13,00	12,00	23,00
	2	13,00	12,00	21,00
	3	12,00	11,00	20,00
	4	12,00	11,00	18,00
	5	9,00	9,00	18,00
	6	8,00	8,00	14,00
	Mittelwert	11,17	10,50	19,00
	SD	2,14	1,64	3,1
PLLA	1	8,00	16,00	27,00
	2	8,00	13,00	8,00
	3	7,00	13,00	2,00
	4	7,00	5,00	1,00
	5	5,00	4,00	–
	6	3,00	2,00	–
	Mittelwert	6,33	8,83	9,50
	SD	1,97	5,85	12,07
bovine BM-CH	1	167,00	107,00	155,00
	2	135,00	99,00	136,00
	3	133,00	83,00	122,00
	4	105,00	74,00	79,00
	5	96,00	71,00	62,00
	6	61,00	64,00	52,00
	Mittelwert	116,17	83,00	101,00
	SD	36,87	16,84	42,4
humane BM-CH	1	39,00	82,00	48,00
	2	27,00	63,00	33,00
	3	27,00	47,00	29,00
	4	26,00	38,00	29,00
	5	21,00	33,00	27,00
	6	15,00	30,00	23,00
	Mittelwert	25,83	48,83	31,50
	SD	7,96	20,13	8,71

A.3 Widerstandsmessungen (TER)

Tabelle A.5: Widerstandswerte mal Fläche von zwei Proben je Material und drei unabhängigen Messreihen über den Verlauf von vier Wochen Kultur.

			Kultur: Widerstand mal Fläche [Ωcm^2]					
Material	**Versuch**	**Probe**	**2 d**	**7 d**	**12 d**	**14 d**	**21 d**	**28 d**
Insert	TER 1	1	1,12	22,03	27,63	28,00	28,00	24,08
		2	1,12	20,72	26,32	25,57	25,76	22,21
	TER 2	2	3,36	24,64	27,07	24,08	19,60	20,35
		3	3,92	24,64	27,25	24,08	17,36	20,53
	TER 3	1	1,87	17,55	25,39	25,76	23,33	22,59
		2	1,68	19,41	25,39	25,01	24,08	23,15
Kollagen	TER 1	1	0,37	4,48	11,39	12,32	7,65	6,72
		3	0,37	9,89	11,20	14,56	12,88	5,41
	TER 2	1	0,93	12,32	14,93	13,07	16,99	15,12
		3	0,56	9,89	14,56	13,25	13,44	19,79
	TER 3	1	−0,19	10,64	13,07	13,44	12,32	16,43
		3	−0,19	10,64	8,96	12,32	10,64	12,32
Amnion	TER 1	1	0,00	6,72	15,31	14,56	12,32	10,64
		2	0,00	6,91	8,96	7,28	10,08	7,84
	TER 2	2	0,00	7,47	12,13	8,96	10,45	13,44
		3	0,56	7,28	14,56	8,96	7,09	10,08
	TER 3	1	0,75	10,08	15,68	9,33	8,96	6,72
		2	0,75	11,20	15,68	16,80	8,96	7,84
Seide	TER 1	1	5,41	5,23	11,01	6,72	8,96	8,59
		3	4,11	6,35	8,96	8,96	11,20	3,73
	TER 2	1	2,99	10,64	11,20	11,20	15,68	14,56
		2	1,87	5,04	8,96	9,89	8,96	8,96
	TER 3	1	7,84	7,84	12,88	12,51	8,96	5,41
		2	0,00	5,23	9,33	9,71	3,17	5,60

A.4 *LightCycler* CP Werte

A.4.1 Referenzgen HPRT1

Tabelle A.6: *Crossing Points* (CP) des Haushaltsgens HPRT1 aus allen RT-PCR Läufen mit 3 µl cDNA boviner RPE Zellen. $\overline{CP} \mathrel{\widehat{=}}$ Mittelwert, SD $\mathrel{\widehat{=}}$ Standardabweichung.

bRPE Referenzgen HPRT1: 3 µl cDNA									
		Anlagerung der *Primer*							
		8 s bei 60 °C				**7 s bei 62 °C**			
Material	**Probe**	**CP 1**	**CP 2**	$\overline{\textbf{CP}}$	**SD**	**CP 1**	**CP 2**	$\overline{\textbf{CP}}$	**SD**
Plastik	1	21,43		21,43	–	21,45	21,31	21,38	0,10
	2	22,03		22,03	–	22,01	21,93	21,97	0,06
	3	22,42		22,42	–	22,34	22,30	22,32	0,03
Kollagen	1	21,65		21,65	–	21,62		21,62	–
	2	22,13		22,13	–	22,08		22,08	–
	3	20,75		20,75	–	20,74		20,74	–
Amnion	1	22,59	–	22,59	–	21,98		21,98	–
	2	23,12	21,54	22,33	1,12	22,83		22,83	–
	3	20,82	21,23	21,03	–	21,44		21,44	–
Seide	1	21,21	21,34	21,28	0,09	21,19		21,19	–
	2	21,62	21,84	21,73	0,16	21,75		21,75	–
	3	21,50	21,47	21,49	0,02	22,06		22,06	–
PLLA	1	22,00	21,55	21,78	0,32	21,63		21,63	–
	2	22,53	21,92	22,23	0,43	21,92		21,92	–
	3	22,69	21,42	22,06	0,90	22,51		22,51	–

Tabelle A.7: *Crossing Points* (CPs) des Haushaltsgens HPRT1 aus allen RT-PCR Läufen mit 3 µl cDNA boviner IPE Zellen. $\overline{\text{CP}} \mathrel{\widehat{=}}$ Mittelwert, SD $\mathrel{\widehat{=}}$ Standardabweichung.

bIPE Referenzgen HPRT1: 3 µl cDNA													
		Anlagerung der *Primer*											
		8 s bei 60 °C					**7 s bei 62 °C**						
Material	**Probe**	**CP 1**	**CP 2**	**CP 3**	$\overline{\textbf{CP}}$	**SD**	**CP 1**	**CP 2**	**CP 3**	**CP 4**	$\overline{\textbf{CP}}$	**SD**
Plastik	1	22,66	22,51	22,70	22,62	0,1	23,17	22,63	22,79	22,68	22,82	0,24
	2	21,79	21,61	21,61	21,67	0,1	22,06	21,70	22,54	22,49	22,2	0,40
	3	22,94	22,82	23,11	22,96	0,15	23,17	22,90	22,74	—	22,94	0,22
Kollagen	1	21,80			21,80	—	21,78	22,06	22,04		21,96	0,16
	2	21,02			21,02	—	21,03	21,42	21,28		21,24	0,20
	3	21,54			21,54	—	21,58	21,81	21,87		21,75	0,15
Amnion	1	—	22,04		22,04	—	21,49				21,49	—
	2	22,10	24,79		23,45	1,9	21,97				21,97	—
	3	21,87	21,98		21,93	0,08	22,26				22,26	—
Seide	1	22,05			22,05	—	22,10				22,1	—
	2	21,73			21,73	—	21,82				21,82	—
	3	22,10			22,10	—	22,05				22,05	—
PLLA	1	21,89	22,10		22,00	0,15	22,00				22	—
	2	22,25	22,19		22,22	0,04	22,87				22,87	—
	3	—	24,13		24,13	—	23,69				23,69	—

Tabelle A.8: *Crossing Points* (CPs) des Haushaltsgens HPRT1 aus allen RT-PCR Läufen mit 2 µl cDNA boviner RPE und IPE Zellen. $\overline{CP} \mathrel{\widehat{=}}$ Mittelwert, SD $\mathrel{\widehat{=}}$ Standardabweichung.

Referenzgen HPRT1: 2 µl cDNA							
			Anlagerung der *Primer* 8 s bei 60 °C				
Zelltyp	**Material**	**Probe**	**CP 1**	**CP 2**	**CP 3**	$\overline{\textbf{CP}}$	**SD**
bRPE	Plastik	1	22,18	22,17	22,07	22,14	0,05
		2	23,55	22,90	22,64	23,03	0,38
		3	23,34	22,54	23,87	23,25	0,55
	Kollagen	1	22,44	21,97		22,21	0,33
		2	22,98	22,76		22,87	0,16
		3	21,3	21,07		21,19	0,16
	Amnion	1	21,53	23,28	22,35	22,39	0,88
		2	21,98	23,70	22,65	22,78	0,87
		3	21,56	24,20	21,50	22,42	1,54
	Seide	1	21,95	21,73		21,84	0,16
		2	21,88	21,95		21,92	0,05
		3	22,06	21,89		21,98	0,12
	PLLA	1	22,13	22,66	22,51	22,43	0,27
		2	22,45	23,18	21,89	22,51	0,65
		3	22,04	23,28	22,75	22,69	0,62
bIPE	Plastik	1	23,48	23,56	23,54	23,53	0,03
		2	22,99	23,08	22,43	22,83	0,29
		3	23,43	23,20	23,16	23,26	0,12
	Kollagen	1	22,43	22,67	22,72	22,61	0,16
		2	21,81	21,84	21,85	21,83	0,02
		3	22,14	22,27	22,49	22,30	0,18
	Amnion	1	22,83	22,27	22,30	22,47	0,32
		2	23,19	22,78	22,74	22,90	0,25
		3	24,96	22,91	23,02	23,63	1,15
	Seide	1	22,13	22,89	22,71	22,58	0,40
		2	22,32	22,58	22,30	22,40	0,16
		3	22,88	22,86	22,74	22,83	0,08
	PLLA	1	22,16	22,82	22,73	22,57	0,36
		2	23,97	23,72	23,47	23,72	0,25
		3	24,49	24,52	24,30	24,44	0,12

A.4.2 Zielgene

Tabelle A.9: *Crossing Points* (CPs) des RPE65 Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik (n. d. $\widehat{=}$ nicht detektierbar).

Zelltyp	Material	Probe	CP [HPRT1]	CP [RPE65]	ΔCP [RPE65]	ΔΔCP [RPE65]	$2^{-\Delta\Delta CP}$ [RPE65]
bRPE	Plastik	1	21,43	45,91	24,48	0,00	1,00
		2	22,03	42,25	20,22	0,00	1,00
		3	22,42	39,86	17,44	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,65	45,35	23,70	−0,78	1,72
		2	22,13	43,31	21,18	0,96	0,51
		3	20,75	42,28	21,53	4,09	0,06
	Amnion	1	22,59	48,82	26,23	1,75	0,30
		2	22,33	44,60	22,27	2,05	0,24
		3	21,03	47,76	26,74	9,30	0,00
	Seide	1	21,28	49,55	28,28	3,80	0,07
		2	21,73	48,06	26,33	6,11	0,01
		3	21,49	46,10	24,62	7,18	0,01
	PLLA	1	21,78	n. d.	–	–	–
		2	22,23	44,91	22,69	2,47	0,18
		3	22,06	42,56	20,51	3,07	0,12
bIPE	Plastik	1	22,62	45,15	22,53	0,00	1,00
		2	21,67	46,21	24,54	0,00	1,00
		3	22,96	45,96	23,00	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,80	49,10	27,30	4,77	0,04
		2	21,02	44,08	23,06	−1,48	2,79
		3	21,54	44,05	22,51	−0,49	1,41
	Amnion	1	22,04	46,00	23,96	1,43	0,37
		2	23,45	48,08	24,64	0,09	0,94
		3	21,93	46,02	24,10	1,09	0,47
	Seide	1	22,05	41,31	19,26	−3,27	9,62
		2	21,73	43,29	21,56	−2,98	7,89
		3	22,10	42,46	20,36	−2,64	6,25
	PLLA	1	22,00	44,44	22,45	−0,08	1,06
		2	22,22	43,11	20,89	−3,65	12,55
		3	24,13	45,17	21,04	−1,96	3,90

Tabelle A.10: *Crossing Points* (CPs) des CRALBP Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik.

Zelltyp	**Material**	**Probe**	**CP** [HPRT1]	**CP** [CRALBP]	**ΔCP** [CRALBP]	**ΔΔCP** [CRALBP]	$\mathbf{2^{-\Delta\Delta CP}}$ [CRALBP]
bRPE	Plastik	1	21,38	41,99	20,61	0,00	1,00
		2	21,97	43,19	21,22	0,00	1,00
		3	22,32	37,97	15,65	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,62	43,17	21,55	0,94	0,52
		2	22,08	37,79	15,71	−5,51	45,57
		3	20,74	42,46	21,72	6,07	0,01
	Amnion	1	21,98	44,58	22,60	1,99	0,25
		2	22,83	39,42	16,59	−4,63	24,76
		3	21,44	44,50	23,06	7,41	0,01
	Seide	1	21,19	42,65	21,46	0,85	0,55
		2	21,75	41,91	20,16	−1,06	2,08
		3	22,06	40,69	18,63	2,98	0,13
	PLLA	1	21,63	48,28	26,65	6,04	0,02
		2	21,92	35,91	13,99	−7,23	150,12
		3	22,51	44,84	22,33	6,68	0,01
bIPE	Plastik	1	22,82	35,46	12,64	0,00	1,00
		2	22,20	38,26	16,06	0,00	1,00
		3	22,94	38,45	15,51	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,96	37,31	15,35	2,71	0,15
		2	21,24	36,07	14,83	−1,24	2,36
		3	21,75	36,64	14,89	−0,63	1,54
	Amnion	1	21,49	40,22	18,73	6,09	0,01
		2	21,97	35,54	13,57	−2,49	5,63
		3	22,26	38,50	16,24	0,73	0,60
	Seide	1	22,10	38,56	16,46	3,82	0,07
		2	21,82	37,57	15,75	−0,31	1,24
		3	22,05	36,48	14,43	−1,08	2,12
	PLLA	1	22,00	38,70	16,70	4,06	0,06
		2	22,87	40,79	17,92	1,86	0,28
		3	23,69	40,43	16,74	1,23	0,43

Tabelle A.11: *Crossing Points* (CPs) des CD86 Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik.

Zelltyp	**Material**	**Probe**	**CP** [HPRT1]	**CP** [CD86]	**ΔCP** [CD86]	**ΔΔCP** [CD86]	$\mathbf{2^{-\Delta\Delta CP}}$ [CD86]
bRPE	Plastik	1	21,38	38,26	16,88	0,00	1,00
		2	21,97	42,28	20,31	0,00	1,00
		3	22,32	43,03	20,71	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,62	26,72	5,10	−11,78	3516,68
		2	22,08	31,90	9,82	−10,49	1438,15
		3	20,74	28,77	8,03	−12,68	6562,36
	Amnion	1	21,98	41,62	19,64	2,76	0,15
		2	22,83	38,72	15,89	−4,42	21,41
		3	21,44	36,44	15,00	−5,71	52,35
	Seide	1	21,19	26,90	5,71	−11,17	2304,12
		2	21,75	26,16	4,41	−15,90	61147,25
		3	22,06	24,98	2,92	−17,79	226633,25
	PLLA	1	21,63	42,56	20,93	4,05	0,06
		2	21,92	41,98	20,06	−0,25	1,19
		3	22,51	41,15	18,64	−2,07	4,20
bIPE	Plastik	1	22,82	48,02	25,20	0,00	1,00
		2	22,20	44,45	22,25	0,00	1,00
		3	22,94	47,05	24,11	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,96	46,84	24,88	−0,32	1,25
		2	21,24	45,58	24,34	2,08	0,24
		3	21,75	45,21	23,46	−0,66	1,58
	Amnion	1	21,49	50,18	28,69	3,49	0,09
		2	21,97	45,56	23,59	1,34	0,40
		3	22,26	51,25	28,99	4,88	0,03
	Seide	1	22,10	31,10	9,00	−16,20	75411,66
		2	21,82	32,82	11,00	−11,25	2439,72
		3	22,05	29,03	6,98	−17,13	143763,04
	PLLA	1	22,00	48,60	26,60	1,40	0,38
		2	22,87	51,63	28,76	6,51	0,01
		3	23,69	44,11	20,42	−3,69	12,94

Tabelle A.12: *Crossing Points* (CPs) des VEGF Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik (n. d. $\widehat{=}$ nicht detektierbar).

Zelltyp	Material	Probe	CP [HPRT1]	CP [VEGF]	ΔCP [VEGF]	ΔΔCP [VEGF]	$2^{-\Delta\Delta CP}$ [VEGF]
bRPE	Plastik	1	21,43	33,68	12,25	0,00	1,00
		2	22,03	33,77	11,74	0,00	1,00
		3	22,42	33,52	11,10	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,65	30,73	9,08	−3,17	9,00
		2	22,13	32,34	10,21	−1,53	2,89
		3	20,75	31,58	10,83	−0,27	1,21
	Amnion	1	22,59	n. d.	–	–	–
		2	22,33	32,52	10,19	−1,55	2,93
		3	21,03	28,75	7,73	−3,38	10,37
	Seide	1	21,28	30,88	9,61	−2,65	6,25
		2	21,73	34,06	12,33	0,59	0,66
		3	21,49	34,05	12,57	1,47	0,36
	PLLA	1	21,78	31,75	9,98	−2,28	4,84
		2	22,23	32,73	10,51	−1,24	2,35
		3	22,06	32,33	10,28	−0,83	1,77
bIPE	Plastik	1	22,62	35,99	13,37	0,00	1,00
		2	21,67	33,12	11,45	0,00	1,00
		3	22,96	35,18	12,22	0,00	1,00
	Kollagen	1	21,80	32,13	10,33	−3,04	8,21
		2	21,02	31,23	10,21	−1,24	2,36
		3	21,54	31,05	9,51	−2,71	6,56
	Amnion	1	–	–	–	–	–
		2	23,45	33,54	10,10	−1,36	2,56
		3	21,93	32,87	10,95	−1,28	2,43
	Seide	1	22,05	33,14	11,09	−2,28	4,85
		2	21,73	32,95	11,22	−0,23	1,17
		3	22,10	33,58	11,48	−0,74	1,67
	PLLA	1	22,00	34,03	12,04	−1,33	2,52
		2	22,22	31,87	9,65	−1,80	3,48
		3	–	–	–	–	–

Tabelle A.13: *Crossing Points* (CPs) des PEDF Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik.

Zelltyp	**Material**	**Probe**	**CP** [HPRT1]	**CP** [PEDF]	**ΔCP** [PEDF]	**ΔΔCP** [PEDF]	$\mathbf{2^{-\Delta\Delta CP}}$ [PEDF]
bRPE	Plastik	1	22,14	32,73	10,59	0,00	1,00
		2	23,03	31,75	8,72	0,00	1,00
		3	23,25	32,76	9,51	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,21	30,58	8,38	−2,22	4,64
		2	22,87	32,22	9,35	0,63	0,65
		3	21,19	31,65	10,47	0,95	0,52
	Amnion	1	22,39	35,10	12,71	2,12	0,23
		2	22,78	34,25	11,47	2,75	0,15
		3	22,42	34,69	12,27	2,76	0,15
	Seide	1	21,84	28,65	6,81	−3,78	13,74
		2	21,92	29,42	7,51	−1,22	2,32
		3	21,98	29,58	7,61	−1,91	3,75
	PLLA	1	22,43	35,67	13,24	2,65	0,16
		2	22,51	37,45	14,94	6,22	0,01
		3	22,69	44,83	22,14	12,63	0,00
bIPE	Plastik	1	23,53	45,77	22,24	0,00	1,00
		2	22,83	44,48	21,65	0,00	1,00
		3	23,26	42,18	18,92	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,61	32,46	9,85	−12,39	5367,37
		2	21,83	29,33	7,50	−14,15	18179,19
		3	22,30	30,03	7,73	−11,19	2330,89
	Amnion	1	22,47	34,06	11,59	−10,65	1606,83
		2	22,90	34,08	11,18	−10,47	1418,35
		3	23,63	35,70	12,07	−6,85	115,09
	Seide	1	22,58	26,64	4,06	−18,18	296978,71
		2	22,40	28,68	6,28	−15,37	42250,09
		3	22,83	27,66	4,83	−14,08	17358,24
	PLLA	1	22,57	37,03	14,46	−7,78	220,30
		2	23,72	36,11	12,39	−9,26	611,69
		3	24,44	36,18	11,74	−7,17	144,34

Tabelle A.14: *Crossing Points* (CPs) des CathD Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik.

Zelltyp	**Material**	**Probe**	**CP** [HPRT1]	**CP** [CathD]	**ΔCP** [CathD]	**ΔΔCP** [CathD]	$\mathbf{2^{-\Delta\Delta CP}}$ [CathD]
bRPE	Plastik	1	22,14	19,96	−2,18	0,00	1,00
		2	23,03	20,35	−2,68	0,00	1,00
		3	23,25	19,92	−3,33	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,21	19,93	−2,28	−0,09	1,07
		2	22,87	20,50	−2,37	0,31	0,81
		3	21,19	21,22	0,03	3,36	0,10
	Amnion	1	22,39	20,14	−2,25	−0,07	1,05
		2	22,78	20,32	−2,46	0,22	0,86
		3	22,42	20,42	−2,00	1,33	0,40
	Seide	1	21,84	19,61	−2,23	−0,05	1,04
		2	21,92	19,89	−2,03	0,66	0,64
		3	21,98	19,52	−2,46	0,87	0,55
	PLLA	1	22,43	20,50	−1,93	0,25	0,84
		2	22,51	21,96	−0,55	2,13	0,23
		3	22,69	23,28	0,59	3,92	0,07
bIPE	Plastik	1	23,53	20,46	−3,07	0,00	1,00
		2	22,83	20,55	−2,28	0,00	1,00
		3	23,26	20,73	−2,53	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,61	18,56	−4,05	−0,98	1,97
		2	21,83	19,08	−2,75	−0,47	1,39
		3	22,30	19,87	−2,43	0,10	0,93
	Amnion	1	22,47	20,61	−1,86	1,21	0,43
		2	22,90	20,79	−2,11	0,17	0,89
		3	23,63	20,67	−2,96	−0,43	1,34
	Seide	1	22,58	19,89	−2,69	0,38	0,77
		2	22,40	20,55	−1,85	0,43	0,74
		3	22,83	20,93	−1,90	0,64	0,64
	PLLA	1	22,57	21,03	−1,54	1,53	0,35
		2	23,72	22,52	−1,20	1,08	0,47
		3	24,44	23,55	−0,89	1,65	0,32

Tabelle A.15: *Crossing Points* (CPs) des ZO-1 Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik.

Zelltyp	**Material**	**Probe**	**CP** [HPRT1]	**CP** [ZO-1]	**ΔCP** [ZO-1]	**ΔΔCP** [ZO-1]	$\mathbf{2^{-\Delta\Delta CP}}$ [ZO-1]
bRPE	Plastik	1	22,14	45,12	22,98	0,00	1,00
		2	23,03	41,79	18,76	0,00	1,00
		3	23,25	42,45	19,20	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,21	39,56	17,36	−5,62	49,35
		2	22,87	41,76	18,89	0,13	0,91
		3	21,19	40,45	19,27	0,06	0,96
	Amnion	1	22,39	41,16	18,77	−4,21	18,46
		2	22,78	39,68	16,90	−1,86	3,62
		3	22,42	41,13	18,71	−0,49	1,40
	Seide	1	21,84	40,44	18,60	−4,38	20,82
		2	21,92	40,56	18,65	−0,11	1,08
		3	21,98	40,62	18,65	−0,56	1,47
	PLLA	1	22,43	41,69	19,26	−3,72	13,21
		2	22,51	42,29	19,78	1,02	0,49
		3	22,69	42,86	20,17	0,97	0,51
bIPE	Plastik	1	23,53	41,40	17,87	0,00	1,00
		2	22,83	42,32	19,49	0,00	1,00
		3	23,26	42,23	18,97	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,61	29,24	6,63	−11,24	2418,67
		2	21,83	28,94	7,11	−12,38	5330,30
		3	22,30	29,06	6,76	−12,21	4726,86
	Amnion	1	22,47	40,13	17,66	−0,21	1,16
		2	22,90	40,64	17,74	−1,75	3,36
		3	23,63	40,76	17,13	−1,84	3,57
	Seide	1	22,58	29,91	7,33	−10,54	1488,87
		2	22,40	29,35	6,95	−12,54	5941,73
		3	22,83	29,83	7,00	−11,96	3993,21
	PLLA	1	22,57	41,12	18,55	0,68	0,63
		2	23,72	42,99	19,27	−0,22	1,16
		3	24,44	45,25	20,81	1,85	0,28

Tabelle A.16: *Crossing Points* (CPs) des KRT8 Gens aus der RT-PCR für bRPE und bIPE Zellen auf den Biomaterialien im Bezug zum Haushaltsgen und zur Standardkultur auf Plastik (n. d. $\widehat{=}$ nicht detektierbar).

Zelltyp	Material	Probe	CP [HPRT1]	CP [KRT8]	ΔCP [KRT8]	ΔΔCP [KRT8]	$2^{-\Delta\Delta CP}$ [KRT8]
bRPE	Plastik	1	22,14	51,82	29,68	0,00	1,00
		2	23,03	52,10	29,07	0,00	1,00
		3	23,25	48,61	25,36	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,21	49,92	27,72	−1,97	3,90
		2	22,87	50,65	27,78	−1,29	2,45
		3	21,19	49,27	28,09	2,73	0,15
	Amnion	1	22,39	48,63	26,24	−3,44	10,83
		2	22,78	49,30	26,52	−2,55	5,84
		3	22,42	52,37	29,95	4,59	0,04
	Seide	1	21,84	49,74	27,90	−1,78	3,43
		2	21,92	48,98	27,07	−2,01	4,01
		3	21,98	51,19	29,22	3,86	0,07
	PLLA	1	22,43	n. d.	–	–	–
		2	22,51	47,65	25,14	−3,93	15,21
		3	22,69	52,96	30,27	4,91	0,03
bIPE	Plastik	1	23,53	50,98	27,45	0,00	1,00
		2	22,83	51,24	28,41	0,00	1,00
		3	23,26	51,94	28,68	0,00	1,00
	Kollagen	1	22,61	n. d.	–	–	–
		2	21,83	n. d.	–	–	–
		3	22,30	52,23	29,93	1,25	0,42
	Amnion	1	22,47	48,47	26,00	−1,45	2,73
		2	22,90	47,65	24,75	−3,66	12,64
		3	23,63	47,74	24,11	−4,57	23,70
	Seide	1	22,58	53,55	30,97	3,52	0,09
		2	22,40	n. d.	–	–	–
		3	22,83	51,10	28,27	−0,40	1,32
	PLLA	1	22,57	49,40	26,83	−0,62	1,54
		2	23,72	49,77	26,05	−2,36	5,12
		3	24,44	51,53	27,09	−1,58	3,00

A.5 Histologische Evaluierung nach subkonjunktivaler Transplantation

A.5.1 Kollagen

Tabelle A.17: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Kollagenimplantate in der ersten postoperativen Woche.

Kollagen: Kurzzeit 1 Woche														
	Gesichtsfeld	**Dicke min [µm]**	**Dicke max [µm]**	**Neutrophile**	**Lymphozyten**	**Eosinophile**	**Plasmazellen**	**Makrophagen**	**Riesenzellen**	**Kapsel**	**Vaskularisierung**	**Hämorrhagie**	**Nekrose**	**Granulationsgewebe**
Implantat 1	R1	20	25	1	2	0	3	0	0	nein	nein	nein	nein	ja
	R2			4	2	0	1	1	0					
	Z1			0	0	0	3	0	0					
	Z2													
Implantat 1	R1	10	15	0	3	0	2	0	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2			0	2	0	2	0	0					
	Z1			0	1	0	0	0	0					
	Z2													
Implantat 2	R1	15	17	1	2	0	1	0	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2			0	1	1	0	0	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 3	R1	15	15	6	8	0	0	15	0	++	ja	nein	nein	ja
	R2			2	7	0	0	15	0					
	Z1			2	6	0	0	25	3					
	Z2			3	7	0	0	12	1					

Tabelle A.18: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Kollagenimplantate in der mittleren Nachbeobachtungszeit.

Kollagen: mittlerer Verlauf 2-5 Wochen

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1	15	25	0	0	0	0	0	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2			0	0	0	0	0	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 1	R1	17	17	0	0	0	0	0	0	nein	nein	ja	nein	nein
	R2			0	0	0	0	0	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 2	R1	15	25	0	2	7	0	0	0	nein	ja	nein	nein	ja
	R2			2	7	9	0	3	3					
	Z1			3	8	11	1	3	1					
	Z2													
Implantat 3	R1	12	20	0	0	0	0	15	0	nein	ja	ja	nein	nein
	R2			0	1	0	0	20	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 4	R1	10	20	0	0	0	1	0	0	+	ja	nein	nein	nein
	R2			0	1	3	0	0	0					
	Z1			0	1	0	1	0	0					
	Z2			0	2	1	0	0	0					
Implantat 5	R1	50	140	0	2	0	0	8	0	+	nein	nein	nein	nein
	R2			1	1	0	0	10	0					
	Z1			0	3	0	0	6	0					
	Z2													
Implantat 6	R1	18	18	0	5	0	0	25	0	nein	ja	nein	nein	ja
	R2			1	10	0	0	40	0					
	Z1			1	5	0	0	25	0					
	Z2													
Implantat 7	R1			0	0	0	0	0	0	nein	nein	ja	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													

Tabelle A.19: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Kollagenimplantate in der Nachbeobachtungszeit bis zu 24 Wochen.

Kollagen: Langzeitverlauf ab 6 Wochen

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1	12	15	0	1	0	0	0	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2			0	1	0	0	0	0					
	Z1			0	0	0	1	0	0					
	Z2													
Implantat 1	R1	15	20	0	10	0	2	1	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2			0	1	0	1	0	0					
	Z1			0	0	0	0	0	0					
	Z2													
Implantat 2	R1	10	12	0	0	0	0	0	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2			0	0	0	0	0	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 3	R1			0	0	0	0	5	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													
Implantat 4	R1	10	12	0	0	0	0	0	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													
Implantat 5	R1	15	15	0	0	0	0	0	0	+	ja	ja	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													

A.5.2 Amnion

Tabelle A.20: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Amnionimplantate in der ersten postoperativen Woche.

Amnion: Kurzzeit 1 Woche														
	Gesichtsfeld	**Dicke min [µm]**	**Dicke max [µm]**	**Neutrophile**	**Lymphozyten**	**Eosinophile**	**Plasmazellen**	**Makrophagen**	**Riesenzellen**	**Kapsel**	**Vaskularisierung**	**Hämorrhagie**	**Nekrose**	**Granulationsgewebe**
Implantat 1	R1	20	20	1	5	21	1	2	0	+	nein	ja	nein	ja
	R2			1	1	5	0	0	2					
	Z1			2	4	13	0	1	2					
	Z2			1	3	11	0	0	1					
Implantat 2	R1	15	20	6	7	33	2	2	3	nein	ja	ja	nein	ja
	R2													
	Z1			4	42	27	3	4	4					
	Z2													
Implantat 3	R1	10	20	0	1	0	1	2	3	+	nein	nein	nein	nein
	R2			0	3	0	1	0	0					
	Z1			0	0	0	1	0	2					
	Z2													
Implantat 4	R1	10	15	0	2	0	1	4	2	+	nein	nein	nein	nein
	R2			0	3	0	1	6	1					
	Z1			0	7	0	2	3	3					
	Z2													
Implantat 5	R1	10	15	1	2	0	0	2	2	+	ja	ja	nein	nein
	R2			0	2	0	1	5	3					
	Z1													
	Z2													
Implantat 6	R1	15	20	0	8	0	1	1	1	nein	nein	nein	nein	ja
	R2			0	6	0	1	1	3					
	Z1			0	8	0	0	2	6					
	Z2													

Tabelle A.21: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Amnionimplantate in der mittleren Nachbeobachtungszeit.

Amnion: mittlerer Verlauf 2-5 Wochen

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1	20	20	1	150	14	2	15	1	nein	nein	nein	nein	ja
	R2			4	100	25	1	5	4					
	Z1			2	150	35	2	5	2					
	Z2			3	100	55	2	8	2					
Implantat 2	R1	12	25	0	2	9	0	6	4	+	nein	nein	nein	nein
	R2			0	6	8	1	0	4					
	Z1													
	Z2													
Implantat 3	R1	12	20	0	3	0	0	0	0	+	nein	ja	nein	nein
	R2			0	5	0	0	0	0					
	Z1			0	5	1	1	2	1					
	Z2			0	3	1	0	2	2					
Implantat 4	R1	16	30	2	50	18	2	25	3	nein	ja	ja	nein	ja
	R2			3	10	100	0	3	3					
	Z1			5	20	100	2	15	4					
	Z2													
Implantat 5	R1			3	5	0	0	12	0	++	ja	ja	nein	ja
	R2			5	7	0	0	25	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 6	R1	16	25	0	3	9	1	8	0	+	ja	nein	nein	nein
	R2			0	35	4	0	12	2					
	Z1													
	Z2													
Implantat 6	R1	12	25	0	10	0	3	12	0	++	ja	nein	nein	nein
	R2			0	35	0	4	15	1					
	Z1			0	11	0	2	12	3					
	Z2													
Implantat 7	R1	15	20	0	3	0	1	3	2	+	ja	ja	nein	nein
	R2			0	2	1	0	0	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 8	R1	15	22	2	10	1	3	6	3	nein	ja	ja	nein	ja
	R2			3	15	8	2	4	0					
	Z1			2	8	5	2	6	1					
	Z2													

Tabelle A.22: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Amnionimplantate in der Nachbeobachtungszeit bis zu 14 Wochen.

Amnion: Langzeitverlauf ab 6 Wochen														
	Gesichtsfeld	**Dicke min [µm]**	**Dicke max [µm]**	**Neutrophile**	**Lymphozyten**	**Eosinophile**	**Plasmazellen**	**Makrophagen**	**Riesenzellen**	**Kapsel**	**Vaskularisierung**	**Hämorrhagie**	**Nekrose**	**Granulationsgewebe**
Implantat 1	R1	17	18	0	0	0	0	0	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2			1	1	0	0	0	0					
	Z1			0	0	0	0	0	0					
	Z2			0	1	0	0	1	0					
Implantat 2	R1	7	10	1	1	1	1	0	0	+	ja	nein	nein	nein
	R2			0	8	2	1	6	1					
	Z1			0	3	0	0	3	0					
	Z2													
Implantat 3	R1	40	80	0	1	0	0	2	0	nein	nein	nein	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													

A.5.3 Seide

Tabelle A.23: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Seidenimplantate in der ersten postoperativen Woche.

Seide: Kurzzeit 1 Woche

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1	20	20	3	10	12	0	1	6	+	nein	nein	nein	ja
	R2			1	4	3	3	0	1					
	Z1			2	0	8	0	0	1					
	Z2			5	15	9	3	0	2					
Implantat 2	R1	30	30	2	0	0	0	1	4	+	nein	nein	nein	nein
	R2			0	3	3	1	0	1					
	Z1			1	1	0	0	0	1					
	Z2													
Implantat 3	R1	40	40	2	3	15	0	1	0	+	nein	nein	nein	ja
	R2			2	7	12	0	3	3					
	Z1			1	0	1	0	0	2					
	Z2			0	5	5	0	0	1					
Implantat 4	R1	40	40	5	3	5	0	2	0	nein	nein	ja	nein	ja
	R2			2	5	5	0	0	0					
	Z1			1	2	2	0	0	0					
	Z2			1	3	3	0	0	0					
Implantat 5	R1	30	30	30	20	120	5	3	0	++	ja	ja	nein	ja
	R2			5	10	15	1	3	1					
	Z1			30	20	10	0	10	0					
	Z2			5	10	20	0	15	0					

Tabelle A.24: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Seidenimplantate in der mittleren Nachbeobachtungszeit.

Seide: mittlerer Verlauf 2-5 Wochen

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1	15	15	10	100	25	4	0	0	nein	ja	ja	nein	ja
	R2			5	15	20	5	0	0					
	Z1			5	100	7	2	0	0					
	Z2			5	50	7	2	0	0					
Implantat 2	R1	17	17	10	30	100	2	0	0	nein	ja	ja	nein	ja
	R2													
	Z1			5	100	100	4	0	1					
	Z2													
Implantat 3	R1	15	15	10	12	15	0	3	0	nein	nein	nein	nein	ja
	R2			3	5	15	1	1	0					
	Z1			30	30	20	5	10	0					
	Z2													
Implantat 4	R1	17	17	5	10	45	0	5	3	nein	ja	ja	nein	ja
	R2													
	Z1			5	10	60	2	0	2					
	Z2													
Implantat 5	R1	18	18	10	20	100	0	5	2	nein	ja	ja	ja	ja
	R2			5	15	25	0	7	2					
	Z1			10	10	100	0	6	1					
	Z2													
Implantat 6	R1	17	17	10	25	60	3	3	0	nein	ja	ja	nein	ja
	R2													
	Z1			15	25	45	2	5	0					
	Z2													
Implantat 7	R1	25	25	3	60	22	5	7	0	nein	ja	ja	nein	ja
	R2			3	32	35	0	5	0					
	Z1			5	50	35	7	3	0					
	Z2			4	35	35	12	3	0					

Tabelle A.25: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um Seidenimplantate in der Nachbeobachtungszeit bis zu 13 Wochen.

Seide: Langzeitverlauf ab 6 Wochen														
	Gesichtsfeld	**Dicke min [µm]**	**Dicke max [µm]**	**Neutrophile**	**Lymphozyten**	**Eosinophile**	**Plasmazellen**	**Makrophagen**	**Riesenzellen**	**Kapsel**	**Vaskularisierung**	**Hämorrhagie**	**Nekrose**	**Granulationsgewebe**
Implantat 1	R1	17	18	2	11	22	1	0	3	nein	ja	ja	nein	ja
	R2			0	2	11	0	0	1					
	Z1			0	3	8	0	0	0					
	Z2			2	15	12	3	7	0					
Implantat 2	R1	18	18	3	7	38	3	8	2	nein	ja	ja	nein	ja
	R2			2	9	15	27	5	2					
	Z1			7	6	2	5	4	1					
	Z2			1	5	37	13	6	1					
Implantat 3	R1	20	20	0	2	0	0	3	0	+	nein	nein	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													
Implantat 4	R1			1	2	2	0	7	0	+	ja	ja	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													

A.5.4 PLLA

Tabelle A.26: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um PLLA Implantate in der ersten postoperativen Woche.

PLLA: Kurzzeit 1 Woche

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1	90	90	0	1	1	0	1	0	+	ja	nein	nein	nein
	R2			0	4	1	0	2	0					
	Z1			0	2	0	0	0	0					
	Z2													
Implantat 2	R1	310	310	10	50	30	3	20	0	nein	ja	ja	nein	ja
	R2			10	50	30	3	20	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 2	R1	160	160	4	15	45	2	15	0	nein	ja	ja	nein	ja
	R2													
	Z1													
	Z2													
Implantat 3	R1	150	150	5	20	150	2	5	0	nein	ja	ja	nein	ja
	R2													
	Z1													
	Z2													
Implantat 4	R1	100	100	0	0	0	0	0	0	+	nein	ja	nein	nein
	R2													
	Z1													
	Z2													
Implantat 5	R1	450	600	0	5	0	1	15	3	++	ja	ja	ja	ja
	R2			0	3	0	0	12	1					
	Z1			0	2	0	0	7	0					
	Z2													

Tabelle A.27: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um PLLA Implantate in der mittleren Nachbeobachtungszeit.

PLLA: mittlerer Verlauf 2-5 Wochen

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1 R2 Z1 Z2	200	200	1	5	3	1	3	5	+	ja	ja	nein	nein
Implantat 2	R1 R2 Z1 Z2	40	40	0 1	2 5	0 0	0 1	0 0	0 0	++	ja	ja	nein	nein
Implantat 3	R1 R2 Z1 Z2	200	200	0 2	5 4	0 0	0 0	30 20	1 1	nein	nein	nein	nein	ja
Implantat 3	R1 R2 Z1 Z2	200	230	2 2	3 6	0 0	0 0	20 25	3 1	nein	nein	nein	nein	ja
Implantat 4	R1 R2 Z1 Z2	190	190	0	20	0	3	25	0	nein	ja	ja	nein	ja
Implantat 5	R1 R2 Z1 Z2	7	11	1 2 1	15 15 7	0 1 0	1 0 0	8 5 3	0 0 0	+	ja	ja	nein	ja
Implantat 6	R1 R2 Z1 Z2	50	50	1	7	0	1	0	0	+	ja	ja	nein	nein
Implantat 7	R1 R2 Z1 Z2	100	100	0	5	0	0	3	0	nein	nein	nein	nein	nein
Implantat 7	R1 R2 Z1 Z2	100	100	1	32	0	1	3	0	+	ja	ja	nein	nein

Tabelle A.28: Zählung der Entzündungszellen und Vorkommen von Ersatzgewebestrukturen um PLLA Implantate in der Nachbeobachtungszeit bis zu 16 Wochen.

PLLA: Langzeitverlauf ab 6 Wochen

	Gesichtsfeld	Dicke min [µm]	Dicke max [µm]	Neutrophile	Lymphozyten	Eosinophile	Plasmazellen	Makrophagen	Riesenzellen	Kapsel	Vaskularisierung	Hämorrhagie	Nekrose	Granulationsgewebe
Implantat 1	R1	10	10	5	120	0	0	30	6	+	ja	nein	nein	ja
	R2			2	70	0	0	17	3					
	Z1			4	80	0	0	15	4					
	Z2			1	3	0	0	18	2					
Implantat 2	R1	60	60	3	11	0	0	25	0	+	ja	ja	nein	ja
	R2			2	22	0	0	28	0					
	Z1													
	Z2													
Implantat 3	R1	50	50	3	8	0	2	25	0	++	ja	ja	nein	ja
	R2													
	Z1													
	Z2													
Implantat 4	R1	25	25	1	3	0	0	25	7	++	ja	nein	nein	ja
	R2			2	4	0	0	35	8					
	Z1			1	2	0	0	20	7					
	Z2													
Implantat 5	R1	50	50	1	3	0	0	20	4	++	ja	nein	nein	ja
	R2			1	6	0	0	12	15					
	Z1			0	3	0	0	22	9					
	Z2													
Implantat 6	R1	70	70	1	5	0	0	45	1	+	ja	ja	nein	ja
	R2			1	8	0	0	6	1					
	Z1													
	Z2													

Literaturverzeichnis

[Abe *et al.*, 1999] Abe, T., Yoshida, M., Tomita, H., Kano, T., Nakagawa, Y., Sato, M., Wada, Y., Fuse, N., Yamada, T., and Tamai, M. (1999). Functional analysis after auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration. *Tohoku J Exp Med*, 189(4):295–305.

[Abe *et al.*, 2000] Abe, T., Yoshida, M., Tomita, H., Kano, T., Sato, M., Wada, Y., Fuse, N., Yamada, T., and Tamai, M. (2000). Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration: short-term results. *Tohoku J Exp Med*, 191(1):7–20.

[Abe *et al.*, 2007] Abe, T., Yoshida, M., Yoshioka, Y., Wakusawa, R., Tokita-Ishikawa, Y., Seto, H., Tamai, M., and Nishida, K. (2007). Iris pigment epithelial cell transplantation for degenerative retinal diseases. *Prog Retin Eye Res*, 26(3):302–321.

[Ablonczy and Crosson, 2007] Ablonczy, Z. and Crosson, C. E. (2007). VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res*, 85(6):762–771.

[Ahir *et al.*, 2002] Ahir, A., Guo, L., Hussain, A. A., and Marshall, J. (2002). Expression of metalloproteinases from human retinal pigment epithelial cells and their effects on the hydraulic conductivity of bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(2):458–465.

[Aisenbrey *et al.*, 2002] Aisenbrey, S., Lafaut, B. A., Szurman, P., Grisanti, S., Lüke, C., Krott, R., Thumann, G., Fricke, J., Neugebauer, A., Hilgers, R.-D., Esser, P., Walter, P., and Bartz-Schmidt, K. U. (2002). Macular translocation with 360 degrees retinotomy for exudative age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 120(4):451–459.

[Aisenbrey *et al.*, 2006] Aisenbrey, S., Lafaut, B. A., Szurman, P., Hilgers, R.-D., Esser, P., Walter, P., Bartz-Schmidt, K. U., and Thumann, G. (2006). Iris pigment epithelial translocation in the treatment of exudative macular degeneration: a 3-year follow-up. *Arch Ophthalmol*, 124(2):183–188.

[Alexander *et al.*, 1990] Alexander, J. P., Bradley, J. M., Gabourel, J. D., and Acott, T. S. (1990). Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 31(12):2520–2528.

[Alge *et al.*, 2003] Alge, C. S., Suppmann, S., Priglinger, S. G., Neubauer, A. S., May, C. A., Hauck, S., Welge-Lussen, U., Ueffing, M., and Kampik, A. (2003). Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human rpe cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(8):3629–3641.

[Algvere *et al.*, 1997] Algvere, P. V., Berglin, L., Gouras, P., Sheng, Y., and Kopp, E. D. (1997). Transplantation of rpe in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry rpe atrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 235(3):149–158.

[Altman *et al.*, 2003] Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., and Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3):401–416.

[Arlt, 1989] Arlt, G. (1989). *Werkstoffe der Elektrotechnik*. RWTH Aachen. Manuskript.

[Asami *et al.*, 2007] Asami, M., Sun, G., Yamaguchi, M., and Kosaka, M. (2007). Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. *Dev Biol*, 304(1):433–446.

[Ayyala *et al.*, 2000] Ayyala, R. S., Michelini-Norris, B., Flores, A., Haller, E., and Margo, C. E. (2000). Comparison of different biomaterials for glaucoma drainage devices: part 2. *Arch Ophthalmol*, 118(8):1081–1084.

[Bai *et al.*, 2008] Bai, L., Zhang, Z., Zhang, H., Li, X., Yu, Q., Lin, H., and Yang, W. (2008). Hiv-1 tat protein alter the tight junction integrity and function of retinal pigment epithelium: an in vitro study. *BMC Infect Dis*, 8:77.

[Barnstable and Tombran-Tink, 2004] Barnstable, C. J. and Tombran-Tink, J. (2004). Neuroprotective and antiangiogenic actions of pedf in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res*, 23(5):561–577.

[Barton *et al.*, 2001] Barton, K., Budenz, D. L., Khaw, P. T., and Tseng, S. C. (2001). Glaucoma filtration surgery using amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(8):1762–1768.

[Benton *et al.*, 2008] Benton, J. A., Kern, H. B., and Anseth, K. S. (2008). Substrate properties influence calcification in valvular interstitial cell culture. *J Heart Valve Dis*, 17(6):689–699.

[Bernatchez *et al.*, 1994] Bernatchez, S. F., Merkli, A., Minh, T. L., Tabatabay, C., Anderson, J. M., and Gurny, R. (1994). Biocompatibility of a new semisolid bioerodible poly(ortho ester) intended for the ocular delivery of 5-fluorouracil. *J Biomed Mater Res*, 28(9):1037–1046.

[Beutel *et al.*, 2007] Beutel, J., Greulich, L., Lüke, M., Ziemssen, F., Szurman, P., Bartz-Schmidt, K.-U., and Grisanti, S. (2007). Inner limiting membrane as membranous support in rpe sheet-transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(10):1469–1473.

[Bhatt *et al.*, 1994] Bhatt, N. S., Newsome, D. A., Fenech, T., Hessburg, T. P., Diamond, J. G., Miceli, M. V., Kratz, K. E., and Oliver, P. D. (1994). Experimental transplantation of human retinal pigment epithelial cells on collagen substrates. *Am J Ophthalmol*, 117(2):214–221.

[Binder *et al.*, 2004] Binder, S., Krebs, I., Hilgers, R.-D., Abri, A., Stolba, U., Assadoulina, A., Kellner, L., Stanzel, B. V., Jahn, C., and Feichtinger, H. (2004). Outcome of transplantation of autologous retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: a prospective trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(11):4151–4160.

[Binder *et al.*, 2007] Binder, S., Stanzel, B. V., Krebs, I., and Glittenberg, C. (2007). Transplantation of the RPE in AMD. *Prog Retin Eye Res*, 26(5):516–554.

[Bok, 2005] Bok, D. (2005). Evidence for an inflammatory process in age-related macular degeneration gains new support. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(20):7053–7054.

[Booij *et al.*, 2010] Booij, J. C., Baas, D. C., Beisekeeva, J., Gorgels, T. G. M. F., and Bergen, A. A. B. (2010). The dynamic nature of bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*, 29(1):1–18.

[Brayden *et al.*, 1988] Brayden, D. J., Cuthbert, A. W., and Lee, C. M. (1988). Human eccrine sweat gland epithelial cultures express ductal characteristics. *J Physiol*, 405:657–675.

[Böcker, 2008] Böcker, W. (2008). *Lehrbuch Pathologie*. Urban & Fischer Verlag, 4. edition.

[Cai *et al.*, 2006] Cai, H., Shin, M. C., Tezel, T. H., Kaplan, H. J., and Priore, L. V. D. (2006). Use of iris pigment epithelium to replace retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: a gene expression analysis. *Arch Ophthalmol*, 124(9):1276–1285.

[Campbell, 1998] Campbell, N. A. (1998). *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag.

[Cangemi, 2007] Cangemi, F. E. (2007). TOZAL Study: an open case control study of an oral antioxidant and omega-3 supplement for dry AMD. *BMC Ophthalmol*, 7:3.

[Caramoy *et al.*, 2010] Caramoy, A., Liakopoulos, S., Menrath, E., and Kirchhof, B. (2010). Autologous translocation of choroid and retinal pigment epithelium in geographic atrophy: long-term functional and anatomical outcome. *Br J Ophthalmol*, page Mar 4. [Epub ahead of print].

[Cereijido *et al.*, 1978] Cereijido, M., Robbins, E. S., Dolan, W. J., Rotunno, C. A., and Sabatini, D. D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol*, 77(3):853–880.

[Chan and Mooney, 2008] Chan, G. and Mooney, D. J. (2008). New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends Biotechnol*, 26(7):382–392.

[Chen *et al.*, 2009a] Chen, F. K., Patel, P. J., Uppal, G. S., Rubin, G. S., Coffey, P. J., Aylward, G. W., and Cruz, L. D. (2009a). A comparison of macular translocation with patch graft in neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(4):1848–1855.

[Chen *et al.*, 2009b] Chen, H., Lukas, T. J., Du, N., Suyeoka, G., and Neufeld, A. H. (2009b). Dysfunction of the retinal pigment epithelium with age: increased iron decreases phagocytosis and lysosomal activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(4):1895–1902.

[Chen *et al.*, 2006] Chen, H. S.-L., Ritch, R., Krupin, T., and Hsu, W.-C. (2006). Control of filtering bleb structure through tissue bioengineering: An animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(12):5310–5314.

[Cheruvu and Kompella, 2006] Cheruvu, N. P. S. and Kompella, U. B. (2006). Bovine and porcine transscleral solute transport: influence of lipophilicity and the choroid-bruch's layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(10):4513–4522.

[Chirila *et al.*, 2008] Chirila, T., Barnard, Z., Zainuddin, Harkin, D. G., Schwab, I. R., and Hirst, L. (2008). Bombyx mori silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of ocular surface disorders. *Tissue Eng Part A*, 14(7):1203–1211.

[Chu and Williams, 1983] Chu, C. C. and Williams, D. F. (1983). The effect of gamma irradiation on the enzymatic degradation of polyglycolic acid absorbable sutures. *J Biomed Mater Res*, 17(6):1029–1040.

[Costa *et al.*, 2006] Costa, R. A., Jorge, R., Calucci, D., Cardillo, J. A., Melo, L. A. S., and Scott, I. U. (2006). Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by amd (ibena study): results of a phase 1 dose-escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(10):4569–4578.

[Crafoord *et al.*, 2001] Crafoord, S., Geng, L., Seregard, S., and Algvere, P. V. (2001). Experimental transplantation of autologous iris pigment epithelial cells to the subretinal space. *Acta Ophthalmol Scand*, 79(5):509–514.

[d'Aquino *et al.*, 2009] d'Aquino, R., Rosa, A. D., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., and Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*, 18:75–83.

[Del Priore *et al.*, 2004] Del Priore, L., Tezel, T., and Kaplan, H. (2004). Survival of allogeneic porcine retinal pigment epithelial sheets after subretinal transplantation. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 45(3):985–992.

[Dreyhaupt *et al.*, 2007] Dreyhaupt, J., Dolar-Szczasny, J., Bindewald, A., Holz, F. G., and Mansmann, U. (2007). Discovery of factors influencing the growth of geographic atrophy in patients with age-related macular degeneration. *Methods Inf Med*, 46(4):432–439.

[Duan *et al.*, 2007] Duan, Y., Wang, Z., Yan, W., Wang, S., Zhang, S., and Jia, J. (2007). Preparation of collagen-coated electrospun nanofibers by remote plasma treatment and their biological properties. *J Biomater Sci Polym Ed*, 18(9):1153–1164.

[Dunn *et al.*, 1996] Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A. E., Putkey, F. R., and Hjelmeland, L. M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*, 62(2):155–169.

[Eckardt *et al.*, 1999] Eckardt, C., Eckardt, U., and Conrad, H. G. (1999). Macular rotation with and without counter-rotation of the globe in patients with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237(4):313–325.

[Edwards *et al.*, 2005] Edwards, A. O., Ritter, R., Abel, K. J., Manning, A., Panhuysen, C., and Farrer, L. A. (2005). Complement factor h polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*, 308(5720):421–424.

[Elner *et al.*, 1992] Elner, S. G., Elner, V. M., Nielsen, J. C., Torczynski, E., Yu, R., and Franklin, W. A. (1992). CD68 antigen expression by human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 55(1):21–28.

[Feeney, 1978] Feeney, L. (1978). Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 17(7):583–600.

[Ferris *et al.*, 1984] Ferris, F. L., Fine, S. L., and Hyman, L. (1984). Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol*, 102(11):1640–1642.

[Fletcher *et al.*, 2008] Fletcher, A. E., Bentham, G. C., Agnew, M., Young, I. S., Augood, C., Chakravarthy, U., de Jong, P. T. V. M., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J. R., and Vioque, J. (2008). Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 126(10):1396–1403.

[Freddo, 1984] Freddo, T. F. (1984). Intercellular junctions of the iris epithelia in macaca mulatta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25(9):1094–1104.

[Friedman *et al.*, 2004] Friedman, D. S., O'Colmain, B. J., Muñoz, B., Tomany, S. C., McCarty, C., de Jong, P. T. V. M., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempen, J., and Group, E. D. P. R. (2004). Prevalence of age-related macular degeneration in the united states. *Arch Ophthalmol*, 122(4):564–572.

[Gelatt, 2007] Gelatt, K. N. (2007). *Veterinary Ophthalmology*. Wiley-Blackwell, 4. edition.

[Gilbert, 2000] Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc.,U.S, 6. edition.

[Giordano *et al.*, 1997] Giordano, G. G., Thomson, R. C., Ishaug, S. L., Mikos, A. G., Cumber, S., Garcia, C. A., and Lahiri-Munir, D. (1997). Retinal pigment epithelium cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res*, 34(1):87–93.

[Gomes *et al.*, 2005] Gomes, J. A. P., Romano, A., Santos, M. S., and Dua, H. S. (2005). Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*, 16(4):233–240.

[González-Mariscal *et al.*, 1984] González-Mariscal, L., de Ramírez, B. C., and Cereijido, M. (1984). Effect of temperature on the occluding junctions of monolayers of epithelioid cells (mdck). *J Membr Biol*, 79(2):175–184.

[Grehn, 2008] Grehn, F. (2008). *Augenheilkunde*. Springer.

[Greiner and Wendorff, 2007] Greiner, A. and Wendorff, J. (2007). Elektrospinnen: eine faszinierende Methode zur Präparation ultradünner Fasern. *Angew. Chem*, 119:5770–5805.

[Group, 2001] Group, A.-R. E. D. S. R. (2001). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins c and e and beta carotene for age-related cataract and vision loss: Areds report no. 9. *Arch Ophthalmol*, 119(10):1439–1452.

[Haas *et al.*, 2008] Haas, S. J.-P., Petrov, S., Kronenberg, G., Schmitt, O., and Wree, A. (2008). Orthotopic transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (csm14.1 cells) into the substantia nigra of hemiparkinsonian rats induces neuronal differentiation and motoric improvement. *J Anat*, 212(1):19–30.

[Hadlock *et al.*, 1999] Hadlock, T., Singh, S., Vacanti, J. P., and McLaughlin, B. J. (1999). Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng*, 5(3):187–196.

[Haines *et al.*, 2005] Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., Spencer, K. L., Kwan, S. Y., Noureddine, M., Gilbert, J. R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E. A., and Pericak-Vance, M. A. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*, 308(5720):419–421.

[Halberstadt and Emerich, 2006] Halberstadt, C. and Emerich, D. F. (2006). *Cellular Transplantation: From Laborabory to Clinic: From Laboratory to Clinic*. Academic Pr Inc, 1. edition.

[Hamilton *et al.*, 2007] Hamilton, R. D., Foss, A. J., and Leach, L. (2007). Establishment of a human in vitro model of the outer blood-retinal barrier. *J Anat*, 211(6):707–716.

[Hartmann *et al.*, 1999] Hartmann, U., Sistani, F., and Steinhorst, U. (1999). Human and porcine anterior lens capsule as support for growing and grafting retinal pigment epithelium and iris pigment epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 237(11):940–945.

[Hawkins *et al.*, 2004] Hawkins, B. S., Bressler, N. M., Miskala, P. H., Bressler, S. B., Holekamp, N. M., Marsh, M. J., Redford, M., Schwartz, S. D., Sternberg, P., Thomas, M. A., Wilson, D. J., and Group, S. S. T. S. R. (2004). Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: ophthalmic findings: Sst report no. 11. *Ophthalmology*, 111(11):1967–1980.

[Hillenkamp *et al.*, 2004] Hillenkamp, J., Hussain, A. A., Jackson, T. L., Cunningham, J. R., and Marshall, J. (2004). The influence of path length and matrix components on ageing characteristics of transport between the choroid and the outer retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(5):1493–1498.

[Hoffmann *et al.*, 2005] Hoffmann, S., He, S., Jin, M., Ehren, M., Wiedemann, P., Ryan, S. J., and Hinton, D. R. (2005). A selective cyclic integrin antagonist blocks the integrin receptors alphavbeta3 and alphavbeta5 and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion. *BMC Ophthalmol*, 5:16.

[Holz *et al.*, 2001] Holz, F. G., Bellman, C., Staudt, S., Schütt, F., and Völcker, H. E. (2001). Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(5):1051–1056.

[Holzapfel *et al.*, 2007] Holzapfel, B., Wickert, L., Dr, P., and Koblenz, B. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2):120.

[Hsu *et al.*, 2000] Hsu, W. C., Spilker, M. H., Yannas, I. V., and Rubin, P. A. (2000). Inhibition of conjunctival scarring and contraction by a porous collagen-glycosaminoglycan implant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(9):2404–2411.

[Huhtala *et al.*, 2007] Huhtala, A., Pohjonen, T., Salminen, L., Salminen, A., Kaarniranta, K., and Uusitalo, H. (2007). In vitro biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from various ocular tissues: direct contact studies. *J Biomed Mater Res A*, 83(2):407–413.

[Hussain *et al.*, 2002] Hussain, A. A., Rowe, L., and Marshall, J. (2002). Age-related alterations in the diffusional transport of amino acids across the human bruch's-choroid complex. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 19(1):166–172.

[Hussain *et al.*, 2010] Hussain, A. A., Starita, C., Hodgetts, A., and Marshall, J. (2010). Macromolecular diffusion characteristics of ageing human bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration (amd). *Exp Eye Res*, 90(6):703–710.

[Hynes and Lavik, 2010] Hynes, S. R. and Lavik, E. B. (2010). A tissue-engineered approach towards retinal repair: scaffolds for cell transplantation to the subretinal space. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 248(6):763–778.

[Itaya *et al.*, 2004] Itaya, H., Gullapalli, V., Sugino, I. K., Tamai, M., and Zarbin, M. A. (2004). Iris pigment epithelium attachment to aged submacular human bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(12):4520–4528.

[Jager *et al.*, 2008] Jager, R. D., Mieler, W. F., and Miller, J. W. (2008). Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 358(24):2606–2617.

[Jahrreiss, 1985] Jahrreiss, H. (1985). *Einführung in die Physik*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

[Jiang *et al.*, 1993] Jiang, L. Q., Jorquera, M., and Streilein, J. W. (1993). Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34(12):3347–3354.

[Jiang *et al.*, 1994] Jiang, L. Q., Jorquera, M., and Streilein, J. W. (1994). Immunologic consequences of intraocular implantation of retinal pigment epithelial allografts. *Exp Eye Res*, 58(6):719–728.

[Jin *et al.*, 2004] Jin, H.-J., Park, J., Valluzzi, R., Cebe, P., and Kaplan, D. L. (2004). Biomaterial films of bombyx mori silk fibroin with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*, 5(3):711–717.

[Joussen *et al.*, 2006] Joussen, A. M., Heussen, F. M. A., Joeres, S., Llacer, H., Prinz, B., Rohrschneider, K., Maaijwee, K. J. M., van Meurs, J., and Kirchhof, B. (2006). Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*, 142(1):17–30.

[Kandula *et al.*, 2010] Kandula, S., Lamkin, J. C., Albanese, T., and Edward, D. P. (2010). Patients' knowledge and perspectives on wet age-related macular degeneration and its treatment. *Clin Ophthalmol*, 4:375–381.

[Kannan *et al.*, 2006] Kannan, R., Zhang, N., Sreekumar, P. G., Spee, C. K., Rodriguez, A., Barron, E., and Hinton, D. R. (2006). Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*, 12:1649–1659.

[Kanuga *et al.*, 2002] Kanuga, N., Winton, H. L., Beauchéne, L., Koman, A., Zerbib, A., Halford, S., Couraud, P.-O., Keegan, D., Coffey, P., Lund, R. D., Adamson, P., and Greenwood, J. (2002). Characterization of genetically modified human retinal pigment epithelial cells developed for in vitro and transplantation studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(2):546–555.

[Karwatowski *et al.*, 1995] Karwatowski, W. S., Jeffries, T. E., Duance, V. C., Albon, J., Bailey, A. J., and Easty, D. L. (1995). Preparation of bruch's membrane and analysis of the age-related changes in the structural collagens. *Br J Ophthalmol*, 79(10):944–952.

[King, 1985] King, B. F. (1985). Distribution and characterization of anionic sites in the basal lamina of developing human amniotic epithelium. *Anat Rec*, 212(1):57–62.

[Klein *et al.*, 2005] Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R. S., Haynes, C., Henning, A. K., SanGiovanni, J. P., Mane, S. M., Mayne, S. T., Bracken, M. B., Ferris, F. L., Ott, J., Barnstable, C., and Hoh, J. (2005). Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*, 308(5720):385–389.

[Ko and Ma, 2009] Ko, Y. G. and Ma, P. X. (2009). Surface-grafting of phosphates onto a polymer for potential biomimetic functionalization of biomaterials. *J Colloid Interface Sci*, 330(1):77–83.

[Kociok *et al.*, 1998] Kociok, N., Heppekausen, H., Schraermeyer, U., Esser, P., Thumann, G., Grisanti, S., and Heimann, K. (1998). The mRNA expression of cytokines and their receptors in cultured iris pigment epithelial cells: a comparison with retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 67(2):237–250.

[Koizumi *et al.*, 2007] Koizumi, N., Rigby, H., Fullwood, N. J., Kawasaki, S., Tanioka, H., Koizumi, K., Kociok, N., Joussen, A. M., and Kinoshita, S. (2007). Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(1):123–134.

[Lappas *et al.*, 2004] Lappas, A., Foerster, A. M. H., Weinberger, A. W. A., Coburger, S., Schrage, N. F., and Kirchhof, B. (2004). Translocation of iris pigment epithelium in patients with exudative age-related macular degeneration: long-term results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 242(8):638–647.

[Lappas *et al.*, 2000] Lappas, A., Weinberger, A. W., Foerster, A. M., Kube, T., Rezai, K. A., and Kirchhof, B. (2000). Iris pigment epithelial cell translocation in exudative age-related macular degeneration. a pilot study in patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238(8):631–641.

[Lawrence *et al.*, 2009] Lawrence, B. D., Marchant, J. K., Pindrus, M. A., Omenetto, F. G., and Kaplan, D. L. (2009). Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials*, 30(7):1299–1308.

[Lee *et al.*, 2006] Lee, C. J., Vroom, J. A., Fishman, H. A., and Bent, S. F. (2006). Determination of human lens capsule permeability and its feasibility as a replacement for bruch's membrane. *Biomaterials*, 27(8):1670–1678.

[Lee *et al.*, 2003] Lee, S. Y., Oh, J. H., Kim, J. C., Kim, Y. H., Kim, S. H., and Choi, J. W. (2003). In vivo conjunctival reconstruction using modified PLGA grafts for decreased scar formation and contraction. *Biomaterials*, 24(27):5049–5059.

[Levis and Daniels, 2009] Levis, H. and Daniels, J. T. (2009). New technologies in limbal epithelial stem cell transplantation. *Curr Opin Biotechnol*, 20(5):593–597.

[Liggett *et al.*, 2009] Liggett, T. E., Griffiths, T. D., and Gaillard, E. R. (2009). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized bovine retinal pigmented epithelial cell line. *BMC Cell Biol*, 10:33.

[Livak and Schmittgen, 2001] Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 25(4):402–408.

[Lloyd *et al.*, 2001] Lloyd, A. W., Faragher, R. G., and Denyer, S. P. (2001). Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials*, 22(8):769–785.

[Lu *et al.*, 2007] Lu, J. T., Lee, C. J., Bent, S. F., Fishman, H. A., and Sabelman, E. E. (2007). Thin collagen film scaffolds for retinal epithelial cell culture. *Biomaterials*, 28(8):1486–1494.

[Luo *et al.*, 2006] Luo, Y., Zhuo, Y., Fukuhara, M., and Rizzolo, L. J. (2006). Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(8):3644–3655.

[Machemer and Steinhorst, 1993] Machemer, R. and Steinhorst, U. H. (1993). Retinal separation, retinotomy, and macular relocation: II. A surgical approach for age-related macular degeneration? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 231(11):635–641.

[Majji *et al.*, 1999] Majji, A. B., Hayashi, A., Kim, H. C., Grebe, R. R., and de Juan, E. (1999). Inhibition of choriocapillaris regeneration with genistein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(7):1477–1486.

[Marmor and Wolfensberger, 1998] Marmor, M. and Wolfensberger, T. (1998). *The retinal pigment epithelium: function and disease*. Oxford University Press New York.

[Martínez-Morales *et al.*, 2004] Martínez-Morales, J. R., Rodrigo, I., and Bovolenta, P. (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays*, 26(7):766–777.

[Meinel *et al.*, 2005] Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Kirker-Head, C., McCool, J., Gronowicz, G., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D. L. (2005). The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 26(2):147–155.

[Mennel *et al.*, 2008] Mennel, S., Meyer, C. H., Schmidt, J. C., Kaempf, S., and Thumann, G. (2008). Trityl dyes patent blue V and brilliant blue G - clinical relevance and in vitro analysis of the function of the outer blood-retinal barrier. *Dev Ophthalmol*, 42:101–114.

[Minoura *et al.*, 1995] Minoura, N., Aiba, S., Gotoh, Y., Tsukada, M., and Imai, Y. (1995). Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *J Biomed Mater Res*, 29(10):1215–1221.

[Montezuma *et al.*, 2006] Montezuma, S. R., Loewenstein, J., Scholz, C., and Rizzo, J. F. (2006). Biocompatibility of materials implanted into the subretinal space of Yucatan pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(8):3514–3522.

[Moore and Clover, 2001] Moore, D. J. and Clover, G. M. (2001). The effect of age on the macromolecular permeability of human bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(12):2970–2975.

[Moroi *et al.*, 2004] Moroi, Y., Fujita, S., Fukagawa, S., Mashino, T., Goto, T., Masuda, T., Urabe, K., Kubo, K., Matsui, H., Kagawa, S., Kuroyanagi, Y., and Furue, M. (2004). Clinical evaluation of allogeneic cultured dermal substitutes for intractable skin ulcers after tumor resection. *Eur J Dermatol*, 14(3):172–176.

[Nabi *et al.*, 1993] Nabi, I. R., Mathews, A. P., Cohen-Gould, L., Gundersen, D., and Rodriguez-Boulan, E. (1993). Immortalization of polarized rat retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*, 104 (Pt 1):37–49.

[Neeley *et al.*, 2008] Neeley, W. L., Redenti, S., Klassen, H., Tao, S., Desai, T., Young, M. J., and Langer, R. (2008). A microfabricated scaffold for retinal progenitor cell grafting. *Biomaterials*, 29(4):418–426.

[Nicolini *et al.*, 2000] Nicolini, J., Kiilgaard, J. F., Wiencke, A. K., Heegaard, S., Scherfig, E., Prause, J. U., and la Cour, M. (2000). The anterior lens capsule used as support material in RPE cell-transplantation. *Acta Ophthalmol Scand*, 78(5):527–531.

[Niederkorn, 2003] Niederkorn, J. Y. (2003). Mechanisms of immune privilege in the eye and hair follicle. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 8(2):168–172.

[Nubile *et al.*, 2008] Nubile, M., Dua, H. S., Lanzini, T. E.-M., Carpineto, P., Ciancaglini, M., Toto, L., and Mastropasqua, L. (2008). Amniotic membrane transplantation for the management of corneal epithelial defects: an in vivo confocal microscopic study. *Br J Ophthalmol*, 92(1):54–60.

[Ohno-Matsui *et al.*, 2005] Ohno-Matsui, K., Ichinose, S., ichi Nakahama, K., Yoshida, T., Kojima, A., Mochizuki, M., and Morita, I. (2005). The effects of amniotic membrane on retinal pigment epithelial cell differentiation. *Mol Vis*, 11:1–10.

[Ohno-Matsui *et al.*, 2006] Ohno-Matsui, K., Mori, K., Ichinose, S., Sato, T., Wang, J., Shimada, N., Kojima, A., Mochizuki, M., and Morita, I. (2006). In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. *Mol Vis*, 12:1022–1032.

[Ohno-Matsui *et al.*, 2001] Ohno-Matsui, K., Morita, I., Tombran-Tink, J., Mrazek, D., Onodera, M., Uetama, T., Hayano, M., Murota, S. I., and Mochizuki, M. (2001). Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol*, 189(3):323–333.

[Pascolini *et al.*, 2004] Pascolini, D., Mariotti, S. P., Pokharel, G. P., Pararajasegaram, R., Etya'ale, D., Négrel, A. D., and Resnikoff, S. (2004). 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol*, 11(2):67–115.

[Pfaffl, 2001] Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45.

[Priore *et al.*, 2002] Priore, L. V. D., Kuo, Y.-H., and Tezel, T. H. (2002). Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(10):3312–3318.

[Priore *et al.*, 2006] Priore, L. V. D., Tezel, T. H., and Kaplan, H. J. (2006). Maculoplasty for age-related macular degeneration: reengineering bruch's membrane and the human macula. *Prog Retin Eye Res*, 25(6):539–562.

[Ratner, 2004] Ratner, B. D. (2004). *Biomaterials Science*. Academic Press.

[Redmond *et al.*, 1998] Redmond, T. M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J. X., Crouch, R. K., and Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet*, 20(4):344–351.

[Rezai *et al.*, 2000] Rezai, K. A., Farrokh-Siar, L., Godowski, K., Patel, S. C., and Ernest, J. T. (2000). A model for xenogenic immune response. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238(4):352–358.

[Rezai *et al.*, 1997a] Rezai, K. A., Lai, W. W., Farrokh-Siar, L., Pearlman, J., Shu, J., Patel, S. C., and Ernest, J. T. (1997a). A new method of culturing and transferring iris pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(11):2255–2260.

[Rezai *et al.*, 1997b] Rezai, K. A., Lappas, A., Farrokh-siar, L., Kohen, L., Wiedemann, P., and Heimann, K. (1997b). Iris pigment epithelial cells of long evans rats demonstrate phagocytic activity. *Exp Eye Res*, 65(1):23–29.

[Rosenfeld *et al.*, 2006] Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y., Kim, R. Y., and Group, M. A. R. I. N. A. S. (2006). Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 355(14):1419–1431.

[Rothamel *et al.*, 2005] Rothamel, D., Schwarz, F., Sager, M., Herten, M., Sculean, A., and Becker, J. (2005). Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*, 16(3):369–378.

[Russ *et al.*, 2009] Russ, H. A., Ravassard, P., Kerr-Conte, J., Pattou, F., and Efrat, S. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cells expanded in vitro from lineage-traced adult human pancreatic beta cells. *PLoS One*, 4(7):e6417.

[Ruszczak and Friess, 2003] Ruszczak, Z. and Friess, W. (2003). Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(12):1679–1698.

[Saari *et al.*, 2001] Saari, J. C., Nawrot, M., Kennedy, B. N., Garwin, G. G., Hurley, J. B., Huang, J., Possin, D. E., and Crabb, J. W. (2001). Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron*, 29(3):739–748.

[Sauerzapfe *et al.*, 2009] Sauerzapfe, B., Krenek, K., Schmiedel, J., Wakarchuk, W. W., Pelantová, H., Kren, V., and Elling, L. (2009). Chemo-enzymatic synthesis of poly-N-acetyllactosamine (poly-LacNAc) structures and their characterization for CGL2-galectin-mediated binding of ECM glycoproteins to biomaterial surfaces. *Glycoconj J*, 26(2):141–159.

[Scheider *et al.*, 1999] Scheider, A., GÃžndisch, O., and Kampik, A. (1999). Surgical extraction of subfoveal choroidal new vessels and submacular haemorrhage in age-related macular degeneration: results of a prospective study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 237(1):10.

[Schmitz-Valckenberg *et al.*, 2006] Schmitz-Valckenberg, S., Bindewald-Wittich, A., Dolar-Szczasny, J., Dreyhaupt, J., Wolf, S., Scholl, H. P. N., Holz, F. G., and in Age-Related Macular Degeneration Study Group, F. A. (2006). Correlation between the area of increased autofluorescence surrounding geographic atrophy and disease progression in patients with amd. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(6):2648–2654.

[Schneeberger and Lynch, 2004] Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(6):C1213–C1228.

[Schofer *et al.*, 2009] Schofer, M. D., Boudriot, U., Wack, C., Leifeld, I., Gräbedünkel, C., Dersch, R., Rudisile, M., Wendorff, J. H., Greiner, A., Paletta, J. R. J., and Fuchs-Winkelmann, S. (2009). Influence of nanofibers on the growth and osteogenic differentiation of stem cells: a comparison of biological collagen nanofibers and synthetic PLLA fibers. *J Mater Sci Mater Med*, 20(3):767–774.

[Sekiyama *et al.*, 2007] Sekiyama, E., Nakamura, T., Kurihara, E., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Takaoka, M., Hamuro, J., and Kinoshita, S. (2007). Novel sutureless transplantation of bioadhesive-coated, freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(4):1528–1534.

[Seo *et al.*, 2002] Seo, K. Y., Kim, C. Y., Lee, J. H., Lee, J. B., and Kim, E. K. (2002). Amniotic membrane transplantation for necrotising conjunctival ulceration following subconjunctival atropine injection. *Br J Ophthalmol*, 86(11):1316–1317.

[Sharifiaghdas *et al.*, 2009] Sharifiaghdas, F., Moghadasali, R., Baharvand, H., Hosseini-Moghaddam, S. M., and Mahmoudnejad, N. (2009). Special characteristics of culturing mature human bladder smooth muscle cells on human amniotic membrane as a suitable matrix. *Urol J*, 6(4):283–288.

[Singh *et al.*, 2001] Singh, S., Woerly, S., and McLaughlin, B. J. (2001). Natural and artificial substrates for retinal pigment epithelial monolayer transplantation. *Biomaterials*, 22(24):3337–3343.

[Smith *et al.*, 2001] Smith, W., Assink, J., Klein, R., Mitchell, P., Klaver, C. C., Klein, B. E., Hofman, A., Jensen, S., Wang, J. J., and de Jong, P. T. (2001). Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*, 108(4):697–704.

[Stanzel *et al.*, 2005] Stanzel, B. V., Espana, E. M., Grueterich, M., Kawakita, T., Parel, J.-M., Tseng, S. C. G., and Binder, S. (2005). Amniotic membrane maintains the phenotype of rabbit retinal pigment epithelial cells in culture. *Exp Eye Res*, 80(1):103–112.

[Strauss, 2005] Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3):845–881.

[Streilein, 2003] Streilein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol*, 74(2):179–185.

[Streuli, 2009] Streuli, C. H. (2009). Integrins and cell-fate determination. *J Cell Sci*, 122(Pt 2):171–177.

[Sundback *et al.*, 2005] Sundback, C. A., Shyu, J. Y., Wang, Y., Faquin, W. C., Langer, R. S., Vacanti, J. P., and Hadlock, T. A. (2005). Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials*, 26(27):5454–5464.

[Sunness *et al.*, 1999] Sunness, J. S., Gonzalez-Baron, J., Applegate, C. A., Bressler, N. M., Tian, Y., Hawkins, B., Barron, Y., and Bergman, A. (1999). Enlargement of atrophy and visual acuity loss in the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 106(9):1768–1779.

[Tezel *et al.*, 2004] Tezel, T. H., Bora, N. S., and Kaplan, H. J. (2004). Pathogenesis of age-related macular degeneration. *Trends Mol Med*, 10(9):417–420.

[Tezel and Priore, 1997] Tezel, T. H. and Priore, L. V. D. (1997). Reattachment to a substrate prevents apoptosis of human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 235(1):41–47.

[Tezel and Priore, 1999] Tezel, T. H. and Priore, L. V. D. (1999). Repopulation of different layers of host human bruch's membrane by retinal pigment epithelial cell grafts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(3):767–774.

[Tezel *et al.*, 1996] Tezel, T. H., Priore, L. V. D., Flowers, B. E., Grosof, D. H., Benenson, I. L., Zamora, R. L., and Kaplan, H. J. (1996). Correlation between scanning laser ophthalmoscope microperimetry and anatomic abnormalities in patients with subfoveal neovascularization. *Ophthalmology*, 103(11):1829–1836.

[Thomas *et al.*, 1992] Thomas, M. A., Grand, M. G., Williams, D. F., Lee, C. M., Pesin, S. R., and Lowe, M. A. (1992). Surgical management of subfoveal choroidal neovascularization. *Ophthalmology*, 99(6):952–68.

[Thumann, 2001] Thumann, G. (2001). Development and cellular functions of the iris pigment epithelium. *Surv Ophthalmol*, 45(4):345–354.

[Thumann *et al.*, 2000] Thumann, G., Aisenbrey, S., Schraermeyer, U., Lafaut, B., Esser, P., Walter, P., and Bartz-Schmidt, K. (2000). Transplantation of autologous iris pigment epithelium after removal of choroidal neovascular membranes. *Archives of Ophthalmology*, 118(10):1350.

[Thumann *et al.*, 1999a] Thumann, G., Bartz-Schmidt, K. U., Bakri, H. E., Schraermeyer, U., Spee, C., Cui, J. Z., Hinton, D. R., Ryan, S. J., and Heimann, K. (1999a). Transplantation of autologous iris pigment epithelium to the subretinal space in rabbits. *Transplantation*, 68(2):195–201.

[Thumann *et al.*, 1998] Thumann, G., Bartz-Schmidt, K. U., Heimann, K., and Schraermeyer, U. (1998). Phagocytosis of rod outer segments by human iris pigment epithelial cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 236(10):753–757.

[Thumann *et al.*, 2006] Thumann, G., Hueber, A., Dinslage, S., Schaefer, F., Yasukawa, T., Kirchhof, B., Yafai, Y., Eichler, W., Bringmann, A., and Wiedemann, P. (2006). Characteristics of iris and retinal pigment epithelial cells cultured on collagen type I membranes. *Curr Eye Res*, 31(3):241–249.

[Thumann *et al.*, 1999b] Thumann, G., Kociok, N., Bartz-Schmidt, K. U., Esser, P., Schraermeyer, U., and Heimann, K. (1999b). Detection of mRNA for proteins involved in retinol metabolism in iris pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237(12):1046–1051.

[Thumann *et al.*, 1997] Thumann, G., Schraermeyer, U., Bartz-Schmidt, K. U., and Heimann, K. (1997). Descemet's membrane as membranous support in RPE/IPE transplantation. *Curr Eye Res*, 16(12):1236–1238.

[Thumann *et al.*, 2009] Thumann, G., Viethen, A., Gaebler, A., Walter, P., Kaempf, S., Johnen, S., and Salz, A. K. (2009). The in vitro and in vivo behaviour of retinal pigment epithelial cells cultured on ultrathin collagen membranes. *Biomaterials*, 30(3):287–294.

[Thurman *et al.*, 2009] Thurman, J. M., Renner, B., Kunchithapautham, K., Ferreira, V. P., Pangburn, M. K., Ablonczy, Z., Tomlinson, S., Holers, V. M., and Rohrer, B. (2009). Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury. *J Biol Chem*, 284(25):16939–16947.

[Ti *et al.*, 2002] Ti, S.-E., Anderson, D., Touhami, A., Kim, C., and Tseng, S. C. G. (2002). Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(8):2584–2592.

[Tigli *et al.*, 2009] Tigli, R. S., Ghosh, S., Laha, M. M., Shevde, N. K., Daheron, L., Gimble, J., Gümüşderelioglu, M., and Kaplan, D. L. (2009). Comparative chondrogenesis of human cell sources in 3D scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*, 3(5):348–360.

[Toda *et al.*, 2007] Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T., and Nikaido, T. (2007). The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*, 105(3):215–228.

[Tomany *et al.*, 2004] Tomany, S. C., Cruickshanks, K. J., Klein, R., Klein, B. E. K., and Knudtson, M. D. (2004). Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol*, 122(5):750–757.

[Tomita *et al.*, 2005] Tomita, M., Lavik, E., Klassen, H., Zahir, T., Langer, R., and Young, M. J. (2005). Biodegradable polymer composite grafts promote the survival and differentiation of retinal progenitor cells. *Stem Cells*, 23(10):1579–1588.

[Tsai *et al.*, 2007] Tsai, S.-H., Liu, Y.-W., Tang, W.-C., Zhou, Z.-W., Hwang, C.-Y., Hwang, G.-Y., Ou, B.-R., Hu, C.-P., Yang, V. C., and Chen, J.-K. (2007). Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*, 357(4):984–990.

[Tseng *et al.*, 1997] Tseng, S. C., Prabhasawat, P., and Lee, S. H. (1997). Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*, 124(6):765–774.

[van Meurs *et al.*, 2004] van Meurs, J. C., ter Averst, E., Hofland, L. J., van Hagen, P. M., Mooy, C. M., Baarsma, G. S., Kuijpers, R. W., Boks, T., and Stalmans, P. (2004). Autologous peripheral retinal pigment epithelium translocation in patients with subfoveal neovascular membranes. *Br J Ophthalmol*, 88(1):110–113.

[Weiter and Ernest, 1974] Weiter, J. J. and Ernest, J. T. (1974). Anatomy of the choroidal vasculature. *Am J Ophthalmol*, 78(4):583–590.

[Welsch, 2005] Welsch, U. (2005). *Atlas Histologie*. Elsevier, München, 7. edition.

[Wenkel and Streilein, 1998] Wenkel, H. and Streilein, J. W. (1998). Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(10):1823–1834.

[Wenkel and Streilein, 2000] Wenkel, H. and Streilein, J. W. (2000). Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(11):3467–3473.

[Williams, 2008] Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20):2941–2953.

[Yang *et al.*, 2006] Yang, L., Shirakata, Y., Shudou, M., Dai, X., Tokumaru, S., Hirakawa, S., Sayama, K., Hamuro, J., and Hashimoto, K. (2006). New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res*, 326(1):69–77.

[Yoshii and Oka, 2001] Yoshii, S. and Oka, M. (2001). Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. *Brain Res*, 888(1):158–162.

[Zamiri *et al.*, 2007] Zamiri, P., Sugita, S., and Streilein, J. W. (2007). Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial cells and the subretinal space. *Chem Immunol Allergy*, 92:86–93.

[Zhao *et al.*, 2000] Zhao, S., Pinholt, E. M., Madsen, J. E., and Donath, K. (2000). Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *J Craniomaxillofac Surg*, 28(2):116–122.

[Zignani *et al.*, 1998] Zignani, M., Bernatchez, S. F., Minh, T. L., Tabatabay, C., Anderson, J. M., and Gurny, R. (1998). Subconjunctival biocompatibility of a viscous bioerodable poly(ortho ester). *J Biomed Mater Res*, 39(2):277–285.

Veröffentlichungen

A.5.5 Publikationen aus Inhalten der vorliegenden Arbeit

- The in vitro and in vivo behaviour of retinal pigment epithelial cells cultured on ultrathin collagen membranes.
  Thumann G, Viethen A, Gaebler A, Walter P, Kaempf S, Johnen S, Salz AK
  Biomaterials, 2009 30(3): 287–294

- Rekonstruktion der Anatomie des subretinalen Raums bei AMD: Entwicklung von Pigmentepithelzellfolien zur Transplantation in den Bereich degenerierter RPE-Zellen.
  Ophthalmologische Nachrichten, Special: AMD / Netzhaut 08/2009 Seite 10

A.5.6 Publikationen im Rahmen der wissenschaftlichen Tätigkeit

- High efficiency non-viral transfection of retinal and iris pigment epithelial cells with pigment epithelium-derived factor.
  Thumann G, Stöcker M, Maltusch C, Salz AK, Barth S, Walter P, Johnen S
  Gene Therapy, 2010 Feb; 17(2):181-9

- Preservation of photoreceptors in dystrophic RCS rats following allo- and xenotransplantation of IPE cells.
  Thumann G, Salz AK, Walter P, Johnen S
  Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2009 Mar; 247(3):363-9

- Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium.
  Kaempf S, Walter P, Salz AK, Thumann G
  Journal of Neuroscience Methods, 2008 Aug 15; 173(1):47-58

- Effects of bevacizumab (Avastin) on retinal cells in organotypic culture.
  Kaempf S, Johnen S, Salz AK, Weinberger A, Walter P, Thumann G
  Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008 Jul; 49(7):3164-71

A.5.7 Poster

- Growth of IPE and RPE cells on biological and artificial substrata.
  Salz AK, Maltusch C, Peters E, Rieck AC, Gaebler A, Johnen S, Walz A, Walter P, Thumann G
  The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2009, Fort Lauderdale USA, Poster 1835/A525
  Abstract-Preis: ARVO International Travel Grant

- Evaluierung natürlicher und synthetischer Materialien zur subretinalen Transplantation von Pigmentepithelzellen.
  Salz AK, Thumann G
  107. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) 2009, Leipzig, Poster 070

- Tissue engineering of cell monolayers for subretinal transplantation.
  Salz AK, Kaempf S, Johnen S, Maltusch C, Lindt R, Walter P, Thumann G
  The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2008, Fort Lauderdale USA, Poster 279/A588

A.5.8 Vorträge

- Collagen cell carrier in therapy of age-related macula degeneration.
  1st Viscofan BioEngineering Collagen-Symposium 2010, Weinheim

- Entwicklung von Pigmentepithelzellfolien zur subretinalen Transplantation.
  22. Jahrestagung der Retinologischen Gesellschaft 2009, Berlin

- Cells matter: Pigmentzellersatz
  Aachener Fortbildung für Augenärzte 2008, Aachen

- RPE and IPE cell sheets for subretinal transplantation.
  Summerschool der Klinička bolnika Split, Klinički bolnički centar Zagreb und Universitätsaugenklinik Aachen, 2007, Split, Kroatien

Anna-Katharina Salz

Dipl.-Biol.

Persönliche Daten

Geboren am	02. 02. 1980
Geburtsort	Bendorf (Rhein)
Nationalität	Deutsch

Promotion

6/2006–11/2010 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**, *RWTH*, Aachen.
IZKF Aachen/Universitätsaugenklinik
Forschungsgruppe „Okuläre Regeneration und Extrazelluläre Matrix"

Hochschulstudium

10/2000–3/2006 **Diplom**, *TU*, Darmstadt.
Schwerpunktfächer: Mikrobiologie, Tierphysiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie

Schulbildung, Praktika

7/2004–8/2004 **Forschungspraktikum**, *Ben Gurion University of the Negev*, Beer Sheva, Israel.
1999–2000 **Praktikum**, *Institute for Youth Education*, Haifa, Israel.
1990–1999 **Abitur**, *Rhein-Wied-Gymnasium*, Neuwied.

Danksagung

Zuallererst danke ich Frau Prof. Gabriele Thumann für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren, ihre stetige Diskussionsbereitschaft, sowie für ihre wissenschaftliche Förderung und die wertvollen Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Lothar Elling danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Firma Resorba, der Firma Spintec, dem DIZG sowie meinem Kooperationspartner Dr. Andreas Walz von der Universität Marburg danke sich sehr für die Bereitstellung der Biomaterialien und die stets gute Zusammenarbeit.

Herrn Sacha Tholl möchte ich für die Kooperation und seine bereitwillige Hilfe im Rahmen der Diffusionsmessungen danken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Bernd Sellhaus für seine ausführliche und geduldige Beurteilung der Histologien.

Der Arbeitsgruppe Thumann möchte ich meinen herzlichen Dank für die freundschaftliche Atmosphäre, die vielseitigen Anregungen und die große Hilfsbereitschaft aussprechen. Nina Harmening, Anna Dobias und Dörthe Carstesen danke ich für ihre Hilfestellung in stressigen Laborzeiten. Ganz ausdrücklich bedanke ich mich bei Christiane Stickelmann und Dr. Sandra Johnen für ihre großartige fachliche und persönliche Unterstützung in den letzten vier Jahren.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern Elisabeth und Günther Salz, sowie meiner Schwester Magdalena Joisten und meinem Schwager Marcel Joisten, die mir Kraft gegeben und mich motiviert haben, die Doktorarbeit zu meistern.

Ebenfalls sehr dankbar bin ich Kathrin Schuth, Christiane Wirtz und Andrea Gaebler für ihre Freundschaft, die mich stets aufgefangen hat.

Nicht zuletzt möchte ich Florian Heese von ganzem Herzen danken, der mir immer mit viel Geduld und liebevoller Unterstützung während der Doktorarbeit zur Seite gestanden hat und dessen Rückhalt ich mir in jeder Hinsicht sicher sein konnte.