

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
**an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Direktor: Prof. Dr. med. G.I.W. Duncker

**Einfluss von lokal applizierten Knochenmarkzellen und  
CD117+-hämatopoetischen Stammzellen auf den zeitlichen  
Verlauf der kornealen Wundheilung**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ulf Martin Schilling

geboren am 13.03.1977 in Greifswald

Betreuer: Dr. med. Saadettin Sel

Gutachter: Prof. Dr. med G.I.W Duncker  
Prof. Dr. med F. Paulsen  
Prof. Dr. med W. Behrens-Baumann

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens 21.09.2006  
Datum der Verteidigung 04.07.2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000012038**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012038>]

*Diese Arbeit widme ich meiner Familie und meinen Eltern, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.*

### Referat und Bibliographie

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von lokal appliziertem Knochenmark und lokal applizierten CD117+-hämatopoetischen Stammzellen auf den zeitlichen Verlauf der kornealen Wundheilung nach Alkaliverätzungen zu untersuchen.

Erstmals wurden an einem murinen *in vivo/in vitro*-Defekt-Modell der Kornea die Therapieansätze einer Lokalthherapie mit Knochenmark und CD117+-hämatopoetischen Stammzellen verglichen. Dabei wurden die Heilungsrate als Anteil der abgeheilten Hornhäute, Heilungszeit und -geschwindigkeit der Verletzungen untersucht. Zusätzlich wurde eine mögliche Integration der applizierten Zellen in das korneale Epithel überprüft.

Syngenen weiblichen Balb/C-Mäusen wurden in Narkose mit 0,1M NaOH-getränktem Whatman-Papier Hornhautläsionen von zwei mm Durchmesser gesetzt. Nach 6 Stunden (h) *in vivo* wurden die Augen enukliert und in Organkultur gebracht. *In vitro* wurden in den Therapiegruppen zu den Zeitpunkten 6, 12 und 16h post läsionem mit einem Zelltracer markierte Knochenmark- bzw. CD117+-Stammzellen auf die Läsionen appliziert. Als Kontrolle diente Stammzellmedium. Die Größe der Läsionen wurde über einen Verlauf von 4 Tagen an verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert. Immunhistologisch wurden die Korneae anschließend auf den Zelltracer, CD117 und als spezifischen Hornhautepithelzellmarker Cytokeratin 3/12 untersucht.

Nach Applikation von Knochenmark bzw. CD117+-Stammzellen wurde ein signifikanter Anstieg der Heilungsrate gegenüber der Kontrolle beobachtet. Die Therapiegruppen heilten gegenüber der Kontrolle in einem kürzeren Zeitraum. Die Heilungsgeschwindigkeit der Therapiegruppen war signifikant überlegen.

Nach Beendigung der Therapie wurde in allen Gruppen eine signifikante Reduktion der Heilungsgeschwindigkeiten festgestellt. CD117 konnte nicht im heilenden Korneaepithel nachgewiesen werden. Eine Integration der applizierten Zellen war nicht eindeutig nachweisbar.

Diese Ergebnisse könnten neue stammzellbasierte Therapieperspektiven zur Behandlung schwerer Hornhautepithelläsionen eröffnen.

Schilling, Ulf Martin: Einfluss von lokal applizierten Knochenmarkzellen und CD117+-hämatopoetischen Stammzellen auf den zeitlichen Verlauf der kornealen Wundheilung.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 72 Seiten, 2006

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Anatomie und Physiologie der Kornea .....	1
1.2. Korneale Wundheilung .....	5
1.3. Knochenmark .....	8
1.4. Stammzellen .....	8
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1. Materialien .....	15
3.2. Methoden .....	15
3.2.1. <i>Herstellen der Medien</i> .....	15
3.2.2. <i>Gewinnung von Knochenmark</i> .....	15
3.2.3. <i>Separierung von CD117+-HSC</i> .....	16
3.2.4. <i>Nachweis von CD117 an den gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen</i> .....	18
3.2.5. <i>Markieren der Zellen mit Vybrant™-CFDA SE</i> .....	20
3.2.6. <i>Vitalitätsfärbung der Zellen mit Trypanblau</i> .....	20
3.3. Makroskopischer Versuch .....	21
3.3.1. <i>Setzen der Läsionen</i> .....	21
3.3.2. <i>Auftragen der Zellen</i> .....	22
3.3.4. <i>Verlaufsbeobachtung</i> .....	23
3.3.5. <i>Makroskopische Auswertung</i> .....	24
3.4. Histologische Auswertung .....	26
3.4.1. <i>Verarbeitung der Gewebe</i> .....	26
3.4.2. <i>Immunhistochemie</i> .....	26
3.4.3. <i>Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	27
3.4.4. <i>Grundlagen der Konfokalmikroskopie</i> .....	29
3.4.5. <i>HE-Färbung (Hämalaun-Eosin)</i> .....	30
3.4.6. <i>Immunfärbung auf CD117</i> .....	31
3.4.7. <i>Immunfärbung auf Cytokeratin 3/12</i> .....	32
3.4.8. <i>Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	32
3.4.9. <i>Konfokalmikroskopie</i> .....	32

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
4.1. Lokal applizierte CD117-positive hämatopoetische Stammzellen und lokal applizierte Knochenmarkzellen erhöhen die Heilungsrate kornealer Epithelläsionen. ....	33
4.2. CD117+-hämatopoetische Stammzellen und Knochenmarkzellen beschleunigen die korneale Wundheilung. ....	34
4.3. Die Heilungsgeschwindigkeit kornealer Wunden wird von CD117+-HSC und Knochenmarkzellen beschleunigt und verläuft im verwendeten Modell zweiphasig. ....	36
4.4. Zwischen den Hornhautepithelien der behandelten Gruppen besteht morphologisch kein Unterschied. ....	41
4.5. Vybrant™-CFDA SE Zelltracer kann im Hornhautepithel der SZ und KM nachgewiesen werden, eine Zuordnung zu konkreten Zellen ist jedoch nicht möglich. ....	42
4.6. CD117 wird von heilendem kornealen Epithel nicht exprimiert. ....	43
4.7. Cytokeratin 3/12 ist im kornealen Epithel der behandelten Augen nachweisbar. ....	44
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>46</b>
5.1. Effekt von CD117+-hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmarkzellen auf die Heilungsgeschwindigkeit und -rate kornealer Epithelverletzungen. ....	46
5.2. Mögliche Erklärungen .....	47
5.3. Ausblick.....	51
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>53</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>55</b>
<b>8. Anlagen</b> .....	<b>64</b>
<b>9. Thesen</b> .....	<b>68</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

Allgemein übliche Abkürzungen sowie gesetzliche SI-Einheiten werden hier nicht gesondert aufgeführt.

A – Fläche

ANOVA – analysis of variance, Varianzanalyse

CD – Cluster of differentiation, Oberflächenmarker der Differenzierung

CD117<sup>+</sup>-HSC – CD117 positive hämatopoetische Stammzellen

CD117<sup>+</sup>-hämatopoetische Stammzellen

EGF – epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor

F(ab) – Fragment (ab), spezifisches Bindungsfragment der Antikörper

FACS – fluorescence activated cell sorting, Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

G-CSF – granulocysten colony stimulating factor, Granulozytenwachstumsfaktor

h – Stunde(n)

HGF – hepatocyte growth factor, Hepatozytenwachstumsfaktor

IFN – Interferon

Ig – Immunglobulin, Antikörper

IL – Interleukin

KG – Körpergewicht

KM – Knochenmarksgruppe

KO – Kontrollgruppe

MACS – magnetic cell separation, Magnetische Zellseparation

MHC – major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex

n – Anzahl

PBS – phosphate buffered saline, Phosphatpufferlösung

PDGF – platelet derived growth factor, Thrombozytenwachstumsfaktor

RPM – rotations per minute, Umdrehungen pro Minute

SZ – Stammzellgruppe

T – Temperatur

t – Zeit

TGF – transforming growth factor, Transformierender Wachstumsfaktor

TNF – tumour necrosis factor, Tumornekrosefaktor

V – Geschwindigkeit

## 1. Einleitung

Hornhautverletzungen stehen weltweit als Erblindungsursache an dritter Stelle. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erblinden jährlich 1,5 bis 2 Millionen Menschen aufgrund von kornealen Traumen (93). Die Zahl der Hornhautverletzungen liegt um ein Vielfaches höher. Dabei variiert je nach geographischer Lage und Berufsgruppe die Inzidenz zwischen 11/100000 und 799/100000 (93). Damit zählen korneale Verletzungen zu den häufigsten Verletzungen überhaupt.

Viele Hornhautulcera heilen unter Antibiose gut ab, dennoch sind posttraumatische und primäre Epithelisierungsstörungen der Hornhaut auch heute noch schwer behandelbare und langwierige Krankheitsbilder.

Verschiedene Therapiemethoden werden bei der Behandlung dieser Wundheilungsstörungen angewendet. Zur Behandlung schwerwiegender akuter und chronischer kornealer Epithelisierungsstörungen kommen häufig Amnionmembrantransplantationen zum Einsatz (13, 22, 54). Neuere Therapieansätze basieren auf Zellübertragungen ins Wundgebiet. Bisher wurden hierzu kultivierte Epithelzellen (57, 74), kultivierte limbale Stammzellen (43, 45, 60, 76, 78) und Mundschleimhautzellen (18, 55) mit widersprüchlichen Ergebnissen verwendet.

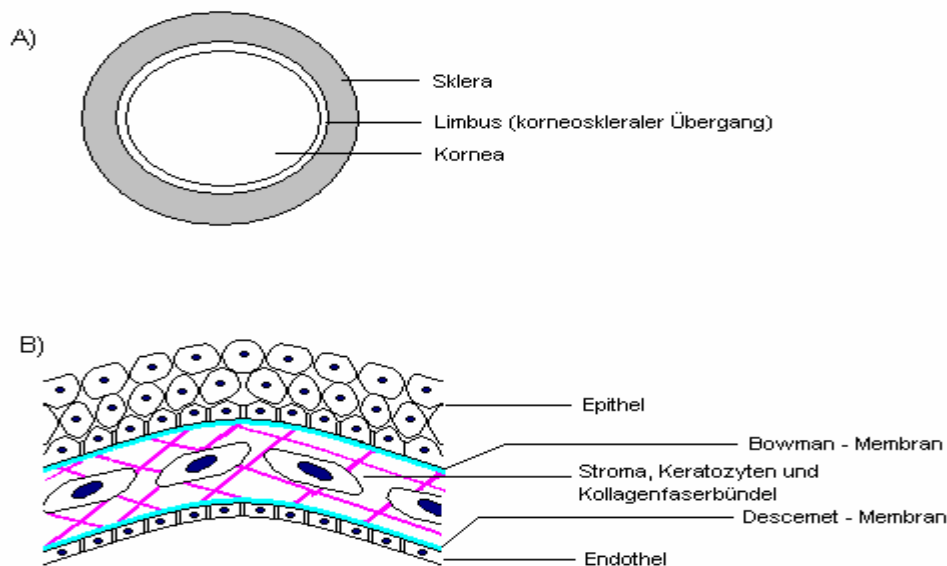
### 1.1. Anatomie und Physiologie der Kornea

#### *Funktion der Kornea*

Der überwiegende Teil der Lichtbrechung im optischen Apparat des Auges erfolgt durch die Hornhaut. Die Lichtdurchlässigkeit und -brechung sind die optische Funktion der Kornea. Des Weiteren stellt die Kornea mechanisch eine Barriere gegenüber der Außenwelt dar. Sie schützt gemeinsam mit den Lidern das Auge vor mechanischen, biologischen, und chemischen Noxen. Am Limbus wird die gefäßreiche Konjunktiva an einem Überwachsen der Kornea gehindert (47, 82).

## Aufbau der Kornea

In einer planaren Ansicht der Kornea (Abb. 1 A, mit Skleralrand) kann eine Einteilung in die ringförmige, vaskularisierte Regenerationszone des Limbus und die avaskuläre zentrale Hornhaut vorgenommen werden. Histologisch (Abb. 1 B) unterscheidet man das mehrschichtige, unverhornte vordere Plattenepithel, die zellfreie Bowman-Membran (*membrana limitans anterior*, Basalmembran, Kollagenfasern und Interzellulärschicht), das Korneastroma (*substantia propria corneae*), die zellfreie Descemet-Membran (*membrana limitans posterior*, Basalmembran) und das einschichtige hintere Hornhautendothel (39).



**Abb. 1. Schematischer Aufbau der Kornea**

**A) Aufsicht auf die Hornhaut, B) Mikroskopischer Aufbau.** (Erläuterungen siehe Text)

Das Epithel der Hornhaut ist definiert als mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel. Es wird aus 6-7 Zellschichten gebildet, wobei eine Abflachung der oberen Zellschichten vorliegt. In den basalen Schichten treten Zellteilungen auf. Durch Hemidesmosomen ist das Epithel an der Bowmanschen Membran verankert, tight-junctions und Desmosomen der äußeren Zellschichten dichten das Epithel gegen den Tränenfilm ab. Wachstumsfaktoren des Tränenfilms (z.B. „epidermal growth factor“ EGF) regen die Zellneubildung an. Ein starker Gewebeumsatz des kornealen Epithels führt zu seiner kompletten Erneuerung in 7-14 Tagen (96).



Verschiedene Moleküle werden von kornealen Epithelien gebildet, insbesondere die Cytokeratine 3 und 12 (Cytokeratin 3/12) werden als spezifisch für korneales Epithel angesehen (83).

Die primäre Regenerationszone des Epithels liegt im Limbus. Am Limbus wird die Hornhaut gegenüber der Sklera und der anliegenden Konjunktiva abgegrenzt (Proliferationsbarriere). Einwachsende Konjunktiva kann zu optischen Störungen führen. Dies geschieht zum Beispiel im Falle eines Pterygiums. Daher ist die Abgrenzung des kornealen vom konjunktivalen Epithel durch den Limbus für die Funktion der Hornhaut von äußerster Wichtigkeit.

Außerdem liegen im Limbus die kornealen Stammzellen (früh differenzierte epitheliale Stammzellen). Im Gegensatz zur zentralen Hornhaut ist der Limbus vaskularisiert. Bei großflächigen Epitheldefekten kann von dieser Zone aus eine komplette Regeneration des Korneaepithels erfolgen.

Das Hornhautstroma ist relativ zellarm. Es besteht aus Keratozyten (Stromazellen), Kollagenfaserbündeln sowie Glykosaminoglykanen. Die mechanische Festigkeit und die Lichtdurchlässigkeit der Hornhaut sowie die zelluläre Immunabwehr durch migrierende Makrophagen werden vom Stroma gewährleistet. Im Stroma verlaufen sensible Nervenfasern des N. trigeminus. Über eine Verschaltung mit dem N. facialis kann eine motorische und sekretorische Reaktion auf Berührungsreize der Kornea in Form einer Abwehrbewegung und erhöhtem Tränenfluß erfolgen.

Das Hornhautendothel ist histologisch ein einschichtiges Plattenepithel. Es dient der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitsbalance der Hornhaut. Durch den osmotischen Gradienten und den Augeninnendruck kommt es zu einer dauernden passiven Flüssigkeitsverschiebung aus der Vorderkammer in das Korneastroma. Wird dem nicht entgegengewirkt, quillt die Interzellulärsubstanz auf. Es resultieren eine Zunahme der Opazität und eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Hornhaut. Damit erhöht sich die Lichtbrechung, während die Lichtdurchlässigkeit sinkt. Das korneale Endothel transportiert kontinuierlich das eindringende Wasser in die Vorderkammer zurück.

Die Basalmembranen grenzen die einzelnen Zellschichten der Kornea voneinander ab. Sie dienen als Proliferationsschienen im Rahmen der Regeneration. Außerdem ermöglichen die Basalmembranen eine Kommunikation zwischen den anliegenden Zellen. Ihre Grundsubstanzen werden von vor und hinter ihnen lokalisierten Zellen

sezerniert. Im Rahmen der Wundheilung können Schäden in den Basalmembranen repariert werden.

### ***Epithelerkrankungen der Kornea und Therapieoptionen***

Der überwiegende Teil der Hornhautverletzungen bedarf keiner spezifischen Therapie. Es können jedoch auch erhebliche Wundheilungsstörungen auftreten. Systemische Erkrankungen, Verletzungen und Infektionen können zu massiven epithelialen Schäden prädisponieren oder diese sogar hervorrufen.

Schwer therapierbare Krankheitsentitäten stellen unter anderem die Limbusinsuffizienz, die Keratopathie im Rahmen des Sjögren-Syndroms und des vernarbenden Schleimhautpemphigoids, chronische Ulcera im Rahmen von Hornhautdystrophien und systemischen Erkrankungen sowie die neurotrophe Keratopathie dar. Chemische und thermische Verletzungen zählen zu den schwersten unfallbedingten Schädigungen der Kornea (69). Alkali-Verletzungen nehmen aufgrund ihres Pathomechanismus eine Sonderstellung unter diesen ein. Im Gegensatz zu Säure-, Hitze- oder Kälteverletzungen, die zu einer Koagulationsnekrose führen, kommt es bei Alkaliverätzungen zu einer Kolliquationsnekrose der betroffenen Gewebe (71). Bei der Koagulationsnekrose denaturieren oberflächliche Proteine. Dabei verknüpfen sie sich miteinander und bilden eine Schutzschicht für tiefer gelegene Gewebe. Bei der Kolliquationsnekrose kommt es dagegen zu einer Auflösung des betroffenen Gewebes. Aus diesem Grund sind Alkaliverletzungen häufig tief und schwer. Oft führen sie zu einem langwierigen und komplizierten Wundheilungsverlauf.

Gängige Therapieoptionen des Hornhautulkus sind Augentropfen, Salben, Kontaktlinsen- und Okklusionsverbände. In schwereren Fällen stehen operative Maßnahmen wie Tarsorrhaphie, Amnionmembrantransplantation, Keratoplastik und Keratoprothetik zur Verfügung. Mit gewissem Erfolg werden bereits Epitheltransplantation, Mucosatransplantation und Limbusstammzellentransplantation angewendet (13, 22, 23, 45, 59). Trotz zum Teil guter Erfolge der konservativen Maßnahmen sind bei Alkaliverletzungen häufig operative Eingriffe erforderlich. Diese gehen mit einem nicht unerheblichen Risiko für das betroffene Auge einher. Aus diesem Grunde wäre eine Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten wünschenswert.

### 1.2. Korneale Wundheilung

Die korneale Wundheilung erfolgt vom Rande der Läsionen in mehreren sich teilweise überlappenden Phasen. Bei der epithelialen Wundheilung werden Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsphase unterschieden. In Abbildung 2 ist der mögliche Verlauf der kornealen Wundheilung schematisch dargestellt.

Während der kornealen Wundheilung finden komplizierte Wechselwirkungen zwischen Epithel-, Stromazellen und extrazellulärer Matrix statt. Auch Konsistenz und Inhaltsstoffe des Tränenfilms üben Einfluß auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der kornealen Zellen aus.

Bei einer Hornhautverletzung kommt es initial zur lokalen Apoptose geschädigter Epithelzellen. Anschließend folgt die Apoptose darunter liegender stromaler Keratozyten (79, 95). Über den trigeminofazialen Reflexbogen wird der Tränenfluß auf ein Vielfaches erhöht. Dadurch kommt es zu einer Spülung der Wunde und einem Einbringen von Wachstumsfaktoren.

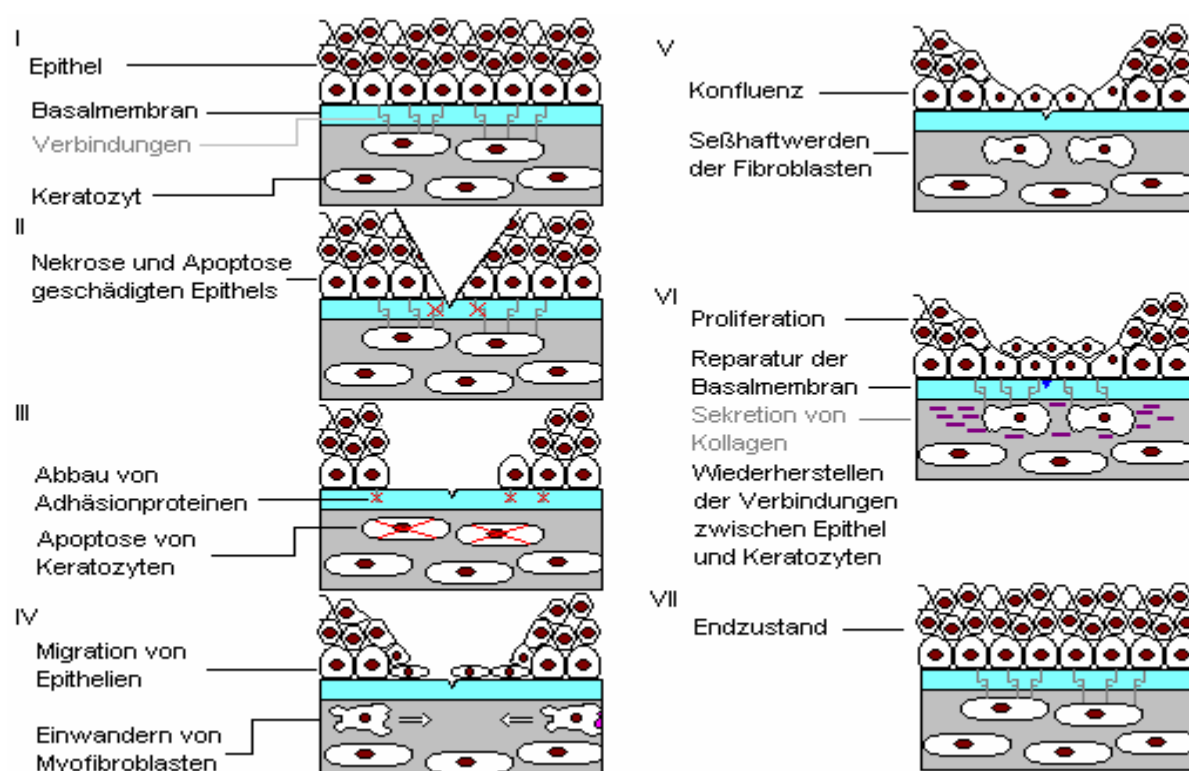
Während der Migrationsphase verändern randständige Epithelzellen ihre Zellkontakte und lösen sich aus dem Zellverband (65). Sie wandern dann zungenförmig vom Rand der Wunde her an der Basalmembran entlang ins Wundgebiet ein, bis eine vollständige Bedeckung des Wundbodens erfolgt ist (7, 104).

Von verschiedenen Autoren wird insbesondere bei größeren Wunden eine Proliferation der migrierenden Epithelzellen bereits während der Migrationsphase postuliert. Diese These wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert (68, 99, 104). In der Proliferationsphase kommt es nach Konfluenz der Zellen auf dem Wundboden zur lokalen Proliferation und zum erneuten Aufbau eines mehrschichtigen Epithels (19, 51, 85, 104).

Während der Differenzierungsphase bilden die Zellen ein der ursprünglichen Struktur ähnliches Gewebe.

Bei der Wundheilung im Stroma kommt es nach der initialen Apoptose lokaler Keratozyten zu einer Umwandlung randständiger Keratozyten in Myofibroblasten (94, 95, 96). Diese wandern vom Randbereich der Kornea ins Wundgebiet ein. Es folgt

eine Phase vermehrter Kollagensynthese, bis schließlich ein dem Primärstatus gleichwertiges Gewebe wieder aufgebaut ist (12, 25).



**Abb. 2. Schematische Darstellung der kornealen Wundheilung.**

I) Im **Normalzustand** kommunizieren Epithelzellen und Keratozyten. II) Eine **Läsion** schädigt das Epithel und die Basalmembran. Die Verbindungen zwischen Epithelzellen und Keratozyten werden unterbrochen (x). III) Die geschädigten Epithelzellen gehen durch Nekrose und Apoptose zugrunde. Im Stroma erfolgt eine Apoptose von Keratozyten (x). **Migrationsphase:** Randständige Epithelzellen brechen die Verbindungen zu ihren Nachbarzellen ab, während sich gleichzeitig benachbarte Keratozyten in Myofibroblasten umwandeln. IV) Die Epithelzellen migrieren in die Wunde, die Myofibroblasten in das darunterliegende Stroma ein (Pfeile). **Proliferationsphase:** V) Die Epithelzellen konfluieren und die eingewanderten Myofibroblasten wandeln sich in Fibroblasten/Keratozyten zurück. Neue Verbindungen werden zwischen Epithelzellen und Keratozyten aufgebaut. VI) Eine Phase der lokalen Proliferation schließt sich an. **Differenzierungsphase:** Kollagen und andere Matrixproteine werden sezerniert und die Basalmembran wird repariert. VII) Ein dem Primärstatus gleichwertiges Gewebe wird wieder ausgebildet.

Bei einer nicht penetrierenden Schädigung der Basalmembran wird auf der geschädigten Seite neues Kollagen sezerniert und die Basalmembran ohne refraktionswirksame Narben wieder aufgebaut. Bei vollständiger Durchbrechung der Basalmembran hingegen kommt es primär zur Deckung der Wunde mit Epithel und Fibroblasten. Anschließend erfolgt der langsame Aufbau einer neuen Basalmembran

zwischen diesen beiden Zellschichten. Dieser Vorgang dauert mindestens zwei Wochen, kann jedoch mehrere Jahre beanspruchen.

Beim Wiederaufbau der Basalmembran werden Narben mit teilweise funktionell minderwertigem Gewebe gebildet (38). Langfristig kann es durch Retraktionsvorgänge in der Narbe zur Beeinträchtigung der optischen und mechanischen Eigenschaften der Kornea kommen.

### ***Die Rolle von Wachstumsfaktoren bei der kornealen Wundheilung***

Multiple Wachstumsfaktoren beeinflussen die Homöostase der Kornea. Sie werden von der Tränendrüse, dem konjunktivalen und kornealen Epithel und den Keratozyten gebildet (81, 96, 97). Über den Tränenfilm sowie para- und autokrine Sekretionsmechanismen werden die Faktoren zu den Effektorzellen transportiert.

In Heilungsphasen kommt es zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Gleichgewichtes dieser Faktoren mit Auswirkungen auf Epithel und Stroma. Es ist seit langem bekannt, dass insbesondere der Balance zwischen IL-1 $\alpha$  und TGF- $\beta$ 2 eine entscheidende Rolle bei der Regeneration der Hornhaut zukommt (96, 97). Viele weitere Faktoren wurden jedoch erst in den letzten Jahren entdeckt und ihre Funktionen sind nur teilweise entschlüsselt. Unter anderem stimulieren auch "Epithelial Growth Factor" (EGF), "Hepatocyte Growth Factor" (HGF) und "Platelet Derived Growth Factor" (PDGF) das Migrations- und Proliferationsverhalten des kornealen Epithels und der Keratozyten (37).

### ***Die Bedeutung von Zell-Matrix-Interaktionen bei der kornealen Wundheilung***

Zell-Matrix-Interaktionen spielen bei der Wundheilung in vielen Geweben eine wichtige Rolle. An der Kornea sind diese Wechselwirkungen bis jetzt nur zum Teil geklärt. Fibronectin z.B. ist ein Bestandteil der Basalmembran, dient jedoch während der kornealen Wundheilung auch als provisorische Adhäsionsmatrix. Wird die Basalmembran beschädigt, können korneale Epithelzellen in die Wunde migrieren. Sie sezernieren dabei aktiv Fibronectin, welches eine provisorische Matrix im Wundgrund bildet (20, 21, 84). Epithelzellen binden über Integrine an Fibronectin, wobei als Verankerungsproteine am Wundgrund sogenannte Hemidesmosomen

geformt werden (24). Auch Laminin-1, Kollagen Typ I und Typ IV, Hyaluronsäure und Galectine (9, 10) sind in dieses komplexe Zusammenspiel involviert.

### 1.3. Knochenmark

Knochenmark ist ein heterogenes Organsystem multipler Zelllinien. Es dient der Blutbildung (Hämatopoese und Thrombopoese) und dem Aufbau des Immunsystems (Myelopoese). Stammzellen verschiedenster Zelllinien und Differenzierungsstufen sind in niedriger Konzentration im Knochenmark enthalten. Knochenmarkszellen kommunizieren zur Aufrechterhaltung der Homöostase durch direkte Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Kontakte und humorale Kontakte miteinander. Lokale und im Blutkreislauf zirkulierende Faktoren regulieren die Neubildung und Freisetzung der im Knochenmark gebildeten Zellen.

### 1.4. Stammzellen

#### ***Eigenschaften von Stammzellen***

Stammzellen sind niedrig differenzierte Zellen, die nicht endgültig auf eine Zelllinie festgelegt sind. Eine solche endgültige Festlegung nennt man Determinierung. Eine Knorpelzelle (Chondrozyt) zum Beispiel kann sich nach heutigem Kenntnisstand nicht in ein rotes Blutkörperchen (Erythrozyt) umwandeln, sie ist determiniert.

Stammzellen können sich selbst regenerieren und in andere Zellarten differenzieren. Stammzellen sind Ursprung für die verschiedensten Gewebe und Zelltypen.

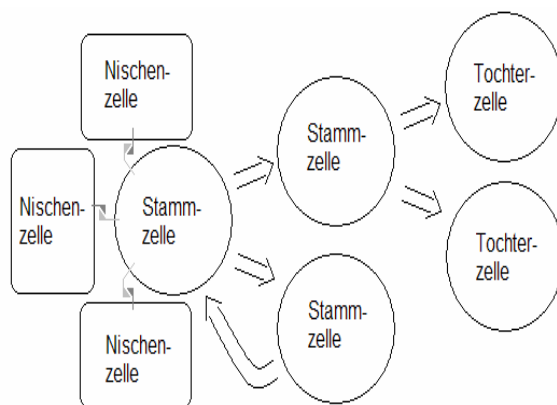
Man unterscheidet embryonale, fötale und adulte Stammzellen entsprechend ihrer Herkunft.

Außerdem unterscheidet man totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen. Totipotente Stammzellen können komplette Organismen bilden. Pluripotente Stammzellen sind fähig, Gewebe aller drei Keimblätter, multipotente hingegen verschiedene Zelltypen ihres spezifischen Gewebes zu bilden.

Embryonale Stammzellen haben die Differenzierung in die verschiedenen Keimblätter noch nicht durchlaufen und sind somit totipotent (17, 50). Fötale Stammzellen sind bereits auf die einzelnen Keimblätter determiniert, sie sind pluripotent.

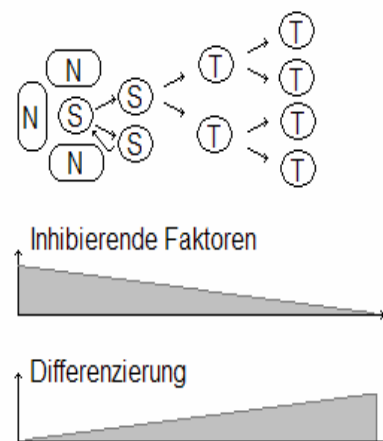
Adulte Stammzellen kommen in fast allen Geweben und verschiedenen Differenzierungsstufen vor (28, 41, 46, 82).

Nach heutigen Erkenntnissen liegen Stammzellen in sogenannten Nischen innerhalb der jeweiligen Gewebe vor (53, 82). Direkte Zell-Zell-Interaktionen mit den umgebenden Zellen (auch Nischenzellen genannt) sowie humorale Faktoren verhindern eine Differenzierung der Stammzellen innerhalb der Nische. Bei Zellteilungen werden die Tochterzellen langsam aus der Nische herausgedrängt und die Differenzierung beginnt in Abhängigkeit der Entfernung zur Nische entsprechend des Konzentrationsgefälles der inhibierenden Zytokine (Abb.3, Abb.4). Verschiedene Faktoren scheinen dafür verantwortlich zu sein: Direkte Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Kontakte und Zytokinkonzentrationen insbesondere von TGF- $\beta$  und FGF (7, 88, 89).



**Abb. 3. Schematische Darstellung der Stammzellnische.**

Der Kontakt mit den Nischenzellen hält die Stammzelle in ihrem undifferenzierten Zustand. Bei einer Zellteilung bleibt eine Tochterzelle als Stammzelle in der Nische zurück, die andere wird herausgedrängt und beginnt sich zu differenzieren.



**Abb. 4. Faktorengefälle und Differenzierung in der Stammzellnische.**

In Abhängigkeit der Entfernung zur Stammzellnische sinkt die Konzentration der hemmenden Faktoren der Nische. Dies führt zur Differenzierung der Stammzellen.

N, Nischenzelle; S, Stammzelle; T, Tochterzelle.

Ab einem bestimmten Zeitpunkt wandeln sich Stammzellen, wenn sie keine neue Nische besetzt haben, zu sogenannten "Transient Amplifying Cells" (TAC's) um. Weitere Teilungs- und Differenzierungsschritte führen dann zu gewebespezifischen Zellen. Bisher wurde TAC's begrenztes Teilungspotential und die Determinierung auf eine bestimmte Zelllinie zugesprochen. Allerdings konnte für korneale Epithelien eine

Entdifferenzierung und Umwandlung in andere Zelllinien nachgewiesen werden (15, 63). Daher muss die Endgültigkeit der zellulären Differenzierung zumindest kritisch betrachtet werden. Somit könnten erkrankte Gewebe mit Hilfe von adulten Stammzellen anderer Zelllinien (insbesondere der hämatopoetischen) durch Einwanderung und Transdifferenzierung von Zellen wieder regeneriert werden.

### **Klassifizierung von Stammzellen anhand der Oberflächenmarker**

Während der verschiedenen Differenzierungsstadien der Zellen kommt es zum Verlust bzw. zur Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene (cluster of differentiation [CD]), anhand derer man die jeweiligen Zelllinien unterscheiden kann (30). Da Stammzellen als Ausgangspunkt verschiedener Zelllinien noch nicht vollständig differenziert sind, ist es möglich, sie anhand ihres Expressionsmusters von anderen Zellen zu unterscheiden. Ein Merkmal von Stammzellen ist das Nichtvorhandensein bestimmter Zelllinienmarker, sie werden dann als lin-negativ (lin-) bezeichnet. Es muss zwischen den verschiedenen Subtypen von Stammzellen differenziert werden. So besitzen z.B. hämatopoetische und korneale Stammzellen verschiedene Oberflächenmoleküle (Tabelle 1). Auf hämatopoetischen Stammzellen vorhandene (positive) Marker sind unter anderem CD117 (c-kit, steel-factor-receptor), sca und CD34 (40, 92).

	Hämatopoetische Stammzelle	Limbale Stammzelle
<b>Sichere Marker</b>	CD34 CD38 CD117 Sca-1	p63 ABCG2 Integrin $\alpha$ 1
<b>Unsichere Marker</b>		Integrin $\beta$ 1 EGF-R K19 Enolase- $\alpha$ HGF-R

Tab. 1. Ausgewählte Oberflächenmarker der hämatopoetischen und limbale Stammzellen (17, 82, 92). (Erläuterungen siehe Text).



### ***Plastizität von Stammzellen***

Lokale und systemische Wachstumsfaktoren steuern die Differenzierung der Stamm- und Tochterzellen in bestimmte Zelllinien, so dass im Prinzip aus einer einzigen Stammzelle und deren Tochterzellen ein komplettes Organsystem (Knochenmark) entstehen kann (44).

Hämatopoetische Stammzellen zirkulieren in geringen Mengen im Blut. Sie besitzen die Möglichkeit der Transdifferenzierung in andere Zelllinien und siedeln sich vor allem in geschädigten Geweben an (1, 29, 34, 75). Es wurde gezeigt, dass in Organtransplantaten Zellen des Transplantatempfängers einwandern, was insbesondere den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen zugeschrieben wird (1, 14, 67).

Eine Subpopulation dieser hämatopoetischen Stammzellen ist unter anderem durch das Vorhandensein des CD117 gekennzeichnet (61). Weitere Bezeichnungen für CD117 sind auch c-kit oder Stammzellfaktorrezeptor.

Es muss beachtet werden, dass Art- und Zeitunterschiede bei der Expression „stammzellspezifischer“ Oberflächenmoleküle vorkommen (26, 61, 72, 86, 101).

Durch gezielte Steuerung der Wachstumsfaktoren im Medium kann eine Differenzierung von Stammzellen in Kultur weitgehend vermieden und somit ihre Pluripotenz erhalten werden. (11, 62) Während früher postuliert wurde, dass eine einmal begonnene Differenzierung irreversibel sei (6, 32), weiß man heute, dass zumindest in den frühen Stadien eine Transdifferenzierung und eine teilweise Entdifferenzierung möglich sind (4, 15, 50).

### ***Aktueller Stand der Stammzelltherapie***

International wurden erste Versuche der Transplantation embryonaler Stammzellen in die verschiedensten Organe unternommen. Die Ergebnisse sind widersprüchlich. In klinischen Versuchen wurde nach Transplantation embryonaler Stammzellen die Entstehung von Tumoren (Teratomen) beobachtet (5, 91). In Deutschland sind sowohl die Forschung an als auch die klinische Anwendung von embryonalen Stammzellen vom Gesetzgeber untersagt.

Die Transplantation adulter menschlicher Stammzellen hingegen wird bereits klinisch mit guten Erfolgen angewendet und zurzeit an verschiedenen Organen erprobt.

Insbesondere in der Hämatologie hat sich in den letzten Jahren die Stammzelltherapie immer mehr als Standardmethode durchgesetzt. In anderen Fachbereichen zeigten erste klinische Studien positive Ergebnisse (17, 29, 36, 44, 98).

Die Gewinnung von Stammzellen ist aufwändig und teuer. Es gibt nur wenige etablierte Therapien auf Stammzellgrundlage. Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Plastizität und Heterogenität der Stammzellen sind noch viele Fragen bezüglich der Kontrolle und Steuerung von Stammzellen im klinischen Kontext unbeantwortet. Die Grenzen der Pluripotenz adulter Stammzellen sind noch unklar (17, 50).

Am Auge wurde bisher eine Stammzelltherapie im Rahmen der limbalen Stammzelltransplantation klinisch angewandt. Dazu werden Limbusstammzellen vom kontralateralen Auge oder von Fremdorganen gewonnen, in Kultur vermehrt und anschließend auf das Auge aufgebracht. So wird eine erneute Epitheldeckung der geschädigten Hornhaut erreicht (45). Ein erster Versuch zur Therapie der Hornhaut mit mesenchymalen Stammzellen wurde zeitgleich zu dieser Untersuchung von Ma et al. durchgeführt (49).

Bei der Verwendung von Stammzellen muss beachtet werden, dass es zu Abstoßungsreaktionen kommen kann. Diese basieren auf den Zellerkennungsmechanismen des Körpers.

Die Zellerkennung ermöglicht die Unterscheidung in körpereigen und körperfremd. Wird eine Zelle als körperfremd erkannt, kann eine Immunantwort ausgelöst werden. Die Immunantwort kann unspezifisch oder spezifisch sein. Abstoßungsreaktionen basieren auf der spezifischen Immunantwort. Drei Proteine sind in der Lage, Antigene spezifisch zu erkennen und so die spezifische Immunantwort auszulösen: Antikörper, der T-Zell-Rezeptor und MHC-Proteine (major histocompatibility complex). Antikörper (Immunglobuline) liegen membrangebunden an B-Lymphozyten oder gelöst im Plasma vor. Sie vermitteln den humoralen Teil der spezifischen Immunantwort. Über ihr antigenbindendes F-ab-Segment fixieren sie sich an einem spezifischen Antigen. Die Immunantwort wird dann über ihr F-c-Segment ausgelöst, indem entweder Komplementfaktoren oder aber Makrophagen gebunden und damit aktiviert werden.

Säugetierzellen besitzen an ihrer Oberfläche MHC-Moleküle. MHC-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und von CD8+-Lymphozyten

erkannt. Weichen sie von bekannten Mustern ab, wird die Immunantwort aktiviert und die Zelle von CD8+-Lymphozyten abgetötet.

B-Lymphozyten und Makrophagen besitzen außerdem MHC-Klasse-II-Moleküle. An ihnen werden auch durch Phagozytose aufgenommene Proteine präsentiert, die dann von CD4+-Lymphozyten erkannt werden können. Weichen die präsentierten Antigene von tolerierten Proteinen ab, aktivieren die CD4+-Lymphozyten die entsprechenden B-Lymphozyten und stimulieren damit die Antikörperproduktion.

Der T-Zell-Rezeptor kann an Antigen binden, wenn es in Zusammenhang mit einem MHC-Komplex präsentiert wird. Wird es als körperfremd erkannt, kommt es zu einer Aktivierung des T-Lymphozyten. Dieser kann dann zum Beispiel die entsprechende Zelle abtöten. Bei Organtransplantationen können diese Mechanismen zu einer Abstoßung der Transplantate führen (70).

Bei systemischen Stammzell- und Knochenmarkstransplantationen kann sich dieser Mechanismus umkehren. Da der Wirt (Transplantatempfänger) in solchen Fällen durch Strahlung und/oder Chemotherapie immundepletiert wurde, wird ein neues Immunsystem vom Transplantat aufgebaut. Wenn die Oberflächenmoleküle der Wirtszellen von den Spenderzellen abweichen, kann es auch zu einer Abstoßung des Körpers durch das Transplantat kommen, der sogenannten "graft-versus-host-disease" (GvHD) mit schwerwiegenden Folgen (70).

Werden autologe (patienteneigene) Stammzellen verwendet, so ist das Risiko der Abstoßungsreaktion sehr niedrig. Gleiches gilt bei syngenem Zellen eineiiger Zwillinge. Syngen bedeutet, dass die Zellen dasselbe Genom besitzen und demzufolge identische Proteine und Oberflächenmarker exprimieren. Daher wurde für die Versuche ein syngenes Mausmodell verwendet. Bei diesem sind die Zellen aller Mäuse miteinander kompatibel, das Risiko für Abstoßungsreaktionen ist folglich minimal.

## 2. Zielstellung

Neuere Untersuchungen konnten eine Integration von systemisch transplantierten hämatopoetischen Stammzellen in verschiedene Organe der Empfänger nachweisen. Dabei wurde eine Transdifferenzierung dieser Stammzellen in Zellen mit organspezifischen Expressionsmustern beobachtet (29, 36, 56, 67, 80, 98).

Im Knochenmark stehen Stammzellen in komplexen Wechselwirkungen mit den umgebenden Zellen (4, 33). Daher ist es interessant, die Wirkungen von kompletten Knochenmark mit denen von CD117+-hämatopoetischen Stammzellen auf die korneale Wundheilung zu vergleichen.

Bei Hornhautepithelialisierungsstörungen erscheint eine systemische Stammzelltransplantation aufgrund der möglichen Komplikationen unverhältnismäßig. Eine lokale Applikation hingegen wäre mit geringem Aufwand für den Patienten ambulant durchführbar.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß lokal applizierter hämatopoetischer Stammzellen sowie lokal applizierten stammzellhaltigen Knochenmarks auf den zeitlichen Verlauf der kornealen Wundheilung in einem murinen *in vivo/in vitro* Modell zu untersuchen. Histologisch sollte eine mögliche Integration der applizierten Zellen in den Gewebeverband und das Expressionsmuster von epithelspezifischem Cytokeratin 3/12 als Zeichen einer eventuellen Transdifferenzierung überprüft werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Materialien**

Eine vollständige Auflistung der verwendeten Materialien ist im Anhang aufgeführt.

### **3.2. Methoden**

#### **3.2.1. Herstellen der Medien**

Stemline II wurde unter der laminar flow mit 100 ng SCF, 100 ng TPO und 100 ng G-CSF je ml versetzt. Penicillin G 100 IE/ml und Streptomycin 100 IE/ml sowie 20 µl L-Glutamin (200 mM/ml) wurden hinzugegeben und das Stammzellmedium mit einem Vortex gemischt.

Hornhautmedium wurde aus 9 Teilen Kulturmedium 1 und einem Teil fetalem Kälberserum (FKS) unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Vor Verwendung wurden die Medien im Brutschrank auf +37°C erwärmt.

#### **3.2.2. Gewinnung von Knochenmark**

40 fünf Wochen alte männliche Balb/C-Mäuse wurden mit Sevofluran narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Die Femora und Beckenknochen wurden entnommen und in sterile PBS (pH 7,4, T=+37°C) gegeben. Sämtliche weitere Schritte erfolgten unter sterilen Kautelen.

Unter einem Operationsmikroskop wurden die Knochen beidseits eröffnet. Mit Hilfe einer Insulinspritze wurde das Knochenmark mit jeweils 3,5 ml Iono-Steril in zwei Eppendorf-Röhrchen ausgespült und durch einen Zellfilter der Porengröße 70 µm gegeben, um eventuelle Kontaminationen mit Muskel- oder Knochenstücken zu vermeiden. Die Zellen wurden über 10 min (Minuten) bei 3000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das entstandene Zell-Pellet wurde in frischem Stammzellmedium gelöst.

Aus 60% des gewonnenen Knochenmarks wurden durch magnetische Zellseparation (MACS) die CD117+-hämatopoetischen Stammzellen (CD117+-HSC) aufgereinigt und die Reinheit sowie Vitalität durch die Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt.

Knochenmark und CD117+-HSC wurden anschließend separat in Stammzellmedium über 24 Stunden (h) inkubiert. Außerdem wurde ein Teil des Stammzellmediums ohne Zugabe von Zellen über den gleichen Zeitraum im Brutschrank belassen. Dieses diente zur Behandlung der Kontrollaugen, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die enthaltenen Wachstumsfaktoren zu eliminieren.

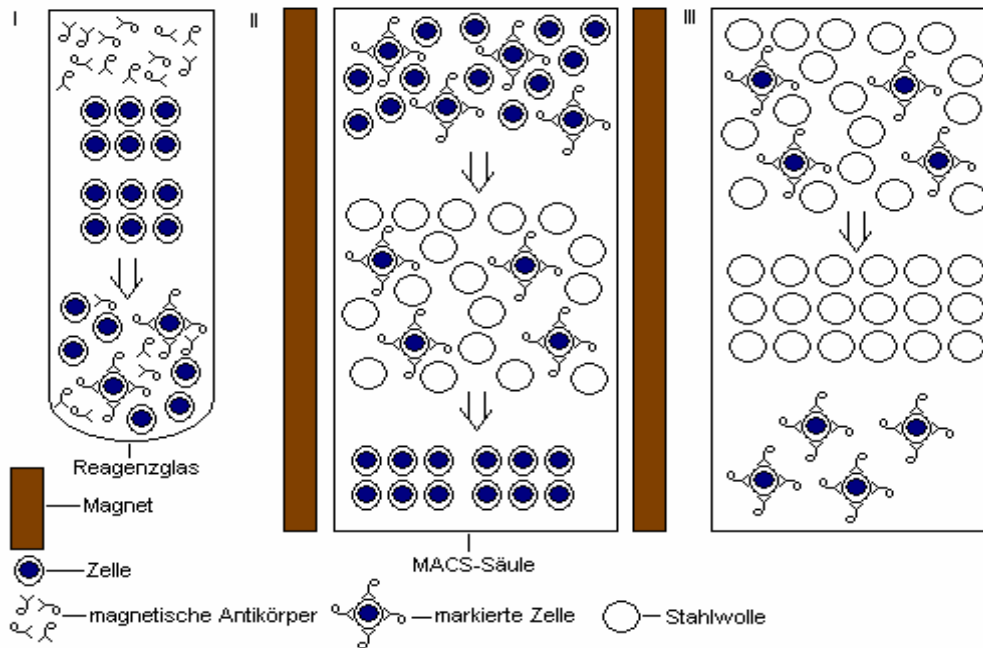
#### **3.2.3. Separierung von CD117+-HSC**

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, bestimmte Zellen aus Zellgemischen zu isolieren. Bei niedrigen Zellzahlen ist MACS die gebräuchlichste Methode.

Die Zellseparation mit Hilfe des MACS beruht auf der spezifischen Markierung von Zellen mit Antikörpern, die mit kleinen Magneten verknüpft sind. In Abbildung 5 ist diese Methode schematisch dargestellt.

Zur Vorbereitung werden die Zellen mit dem Antikörper inkubiert (Abb. 5, I). Dann werden sie durch eine mit Stahlwolle gefüllte Säule gegeben und ein Magnetfeld angelegt (Abb. 5, II). Durch das Feld werden markierte und eisenhaltige Zellen in der Säule festgehalten, während nicht markierte oder eisenarme Zellen durch diese hindurchfließen.

Schaltet man das Magnetfeld aus, können die gewonnenen Zellen aus der Säule gelöst werden (Abb. 5, III). Eine bis zu hundertfache Aufreinigung von Zellen ist in einem Durchlauf möglich. Die Selektion kann sowohl positiv (Markierung der gewünschten Zellen) als auch negativ (Markierung der nicht erwünschten Zellen) erfolgen (16, 52, 73).



**Abb. 5. Prinzip der magnetischen Zellseparierung (MACS).**

I) Das Zellgemisch wird mit magnetgekoppelten Antikörpern inkubiert. Die Antikörper binden spezifisch an das gesuchte Antigen (z.B. CD117). II) Die Zellen werden in der Säule einem Magnetfeld ausgesetzt. Markierte Zellen werden vom Magnetfeld zurückgehalten, nicht markierte Zellen fließen hindurch. III) Die zurückgehaltenen Zellen können nach Entfernen des Magnetfelds aus der Säule eluiert werden.

Die Markhöhlen der entnommenen Knochen wurden mit PBS durchspült, um das enthaltene Knochenmark zu lösen. Entsprechend der Herstellerangaben (Miltenyi) wurde die gewonnene Suspension durch einen Zellfilter (Porengröße 70  $\mu\text{m}$ ) gegeben, um Zellklumpen, Koagel sowie eventuell enthaltene Muskel- und Knochenstücke zu entfernen. Danach wurden die Zellen 10 min bei 2800 RPM (rotations per minute, Umdrehungen je Minute) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewonnenen Pellets wurden in je 100  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer resuspendiert (insgesamt 2 ml). Die verschiedenen Knochenmarksuspensionen wurden gepoolt und eine Probe zur Zellzählung entnommen.

Die Zellzahl wurde auf  $10^7$  Zellen je 80  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer eingestellt. Je  $10^7$  Zellen wurden 20  $\mu\text{l}$  CD117 MicroBeads hinzupipettiert. Über 15 min wurde die Suspension bei  $+4^\circ\text{C}$  inkubiert, dann erfolgte ein Waschvorgang durch Zugabe von 1 ml MACS-Puffer und Zentrifugation bei 2800 RPM über 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer je  $10^8$  Zellen resuspendiert.

Eine AutoMACS-Säule wurde mit MACS-Puffer gefüllt. Das inkubierte Knochenmark wurde in die Säule gegeben und ein Magnetfeld angelegt. Die Separierung erfolgte über 2 Säulen. Die passierenden Zellen wurden aufgefangen und als nicht markiert verworfen. Anschließend wurde das Magnetfeld abgeschaltet und die markierten Zellen wurden aus der Säule mit MACS-Puffer gelöst. Nach Entnahme einer Probe für die Durchflußzytometrie (auch FACS, fluoreszenzaktivierter Zellsorter) wurden die separierten Zellen in Stammzellmedium gegeben ( $1 \times 10^6$ /ml) und im Brutschrank bei  $+37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  für 24 h bis zur Verwendung kultiviert.

#### **3.2.4. Nachweis von CD117 an den gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen**

Oberflächenmoleküle an Zellen in Suspension lassen sich am Durchflußzytometer analysieren (Abb.6). Diese Analyse beruht auf spezifischen Anfärbungen der Moleküle mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Die Zellen müssen zur Messung als Einzelzellsuspension vorliegen. Über eine Kapillare werden die markierten Zellen unter Druck in die Meßküvette gegeben. Dort werden sie durch umgebende Trägersubstanz beschleunigt, wobei die Zellen sich in einer Reihe anordnen (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt werden die Zellen durch einen Laserstrahl geführt. Entsprechend der spezifischen Eigenschaften der Zellen (Zellgröße, Struktur der Zellmembran, intrazelluläre Bestandteile) wird das Licht des Lasers gestreut. Die an die markierten Antikörper gekoppelten Farbstoffe werden angeregt und emittieren Licht eines jeweils spezifischen Spektrums (Emissionsspektrum).

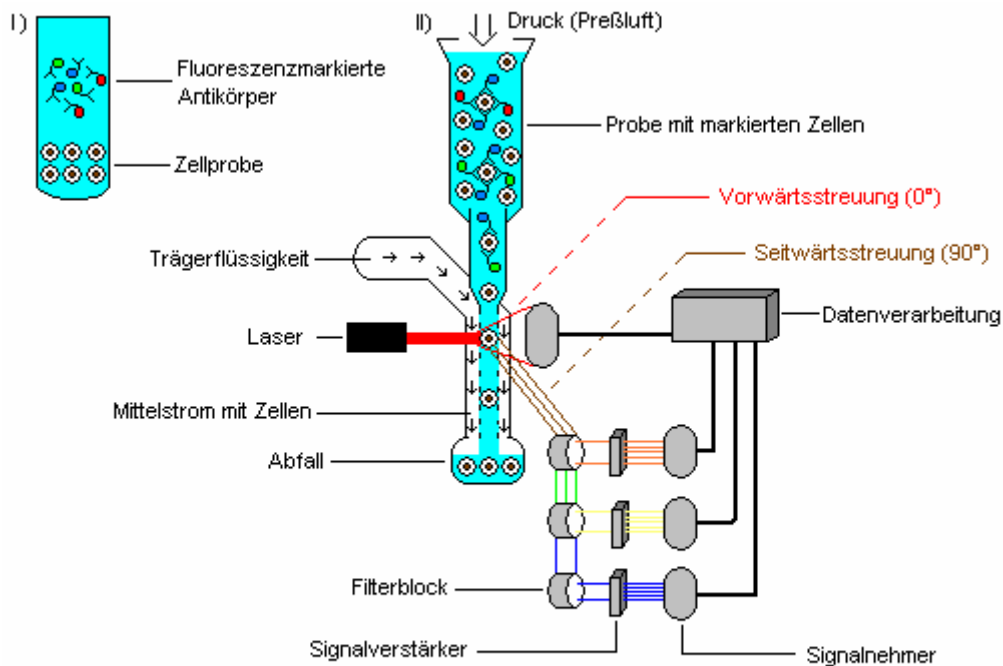
Das in Vorwärtsrichtung des Lasers gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht, engl. FSC [forwards light scatter]) ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum Einfallstrahl gestreute Licht hingegen wird vor allem durch intrazelluläre Zellbestandteile beeinflusst (Seitwärtsstreulicht, engl. SSC [side scatter]).

Mit Hilfe verschiedener Filter kann das dabei emittierte breite Lichtspektrum in seine Bestandteile zerlegt und über Signalnehmer analysiert werden. Aufgrund der niedrigen Intensität des Streulichtes sind Signalverstärker (Photomultiplier) dazwischengeschaltet.

Die gewonnenen Daten können nun mittels eines Rechners verarbeitet, „gefiltert“ und graphisch dargestellt werden (77). Die Einstellung verschiedener Parameter



ermöglicht, Zellen mit den gewünschten Eigenschaften darzustellen (z.B. CD117). Da abgestorbene Zellen Antikörper unspezifisch binden können, muss mit einer Lebend/Tot-Analyse der Anteil dieser Zellen in der Lösung bestimmt werden. Dies geschieht mit Stoffen, die die Membranen nicht geschädigter Zellen nicht durchdringen können wie z.B. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD).



**Abb. 6. Schematischer Aufbau des Durchflusszytometers (FACS).**

I) Die suspendierten Zellen werden mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern inkubiert und spezifisch markiert. II) Das Zellgemisch wird in das Gerät gegeben. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen einzeln durch den Laserstrahl geführt. Dabei wird das Licht des Lasers aufgrund der Eigenschaften der Zelle individuell gestreut. Markierte Zellen weisen andere Streuwerte auf als unmarkierte. Das Streulicht wird nun aufgefangen und analysiert. Damit lassen sich Zellen einzelnen Subpopulationen zuordnen und die Reinheit eines Zellgemisches bestimmen.

Eine Probe der separierten Zellen wurde bei 2800 RPM für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert. 10 µl CD117-Antikörper (unmarkiert) wurden hinzu gegeben und über 10 min bei +4°C inkubiert. Erneut wurde bei 2800 RPM für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert.

Anschließend wurde die Probe mit einem fluoreszenzmarkierten sekundärem Antikörper gegen den CD117-Antikörper (F(ab')<sub>2</sub> goat anti-rabbit Alexa Fluor 633nm

IgG(H+L)) für 10 min bei +4°C inkubiert und nach Zentrifugation erneut einem Waschschrift unterworfen. Die nun auf CD117-markierten Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert, mit 1 µl 7-AAD lebend/tot gefärbt und mit FACS auf ihre Reinheit hin analysiert.

#### **3.2.5. Markieren der Zellen mit Vybrant™-CFDA SE**

Mit dem Zelltracer Vybrant™-CFDA SE (Carboxy-Fluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) können Zellen dauerhaft markiert werden. Diese Zellen und ihre Tochterzellen lassen sich dann im Gewebe nachweisen.

Durch intrazelluläre Esterasen wird Vybrant™-CFDA SE gespalten. Die fluoreszierenden Spaltprodukte binden sich an intrazelluläre Proteine. Die Markierung lässt sich über mehrere Zellteilungen hinweg nachverfolgen. In Zellkultur konnte die Fluoreszenz des Vybrant™-CFDA SE in markierten Zellen nach einer Woche nachgewiesen werden (Angaben des Herstellers).

Die Markierung erfolgte nach dem vom Hersteller (Invitrogen) empfohlenen Protokoll unter Lichtausschluss. 10 mM Vybrant™-CFDA SE wurden in 90 µl DMSO gelöst. Die Konzentration wurde mit PBS auf 10 µM eingestellt (1:1000). Die Knochenmarkszellen und CD117+-HSC wurden abzentrifugiert (10 min x 3000 RPM) und in 1 ml dieser Lösung resuspendiert. Über 15 min wurde bei +37°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in frischem Stammzellmedium resuspendiert. Es folgte eine Inkubation über 30 min bei +37°C. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in frischem Stammzellmedium gelöst.

#### **3.2.6. Vitalitätsfärbung der Zellen mit Trypanblau**

Die Trypanblau-Färbung beruht auf der Tatsache, dass vitale Zellen eine intakte Zellmembran besitzen, welche für Trypanblau impermeabel ist. Ist die Zellmembran jedoch geschädigt, kann Trypanblau in die Zelle eindringen. Färbt man nun eine Zellprobe damit an, so stellen sich lebensfähige Zellen nicht blau gefärbt dar.

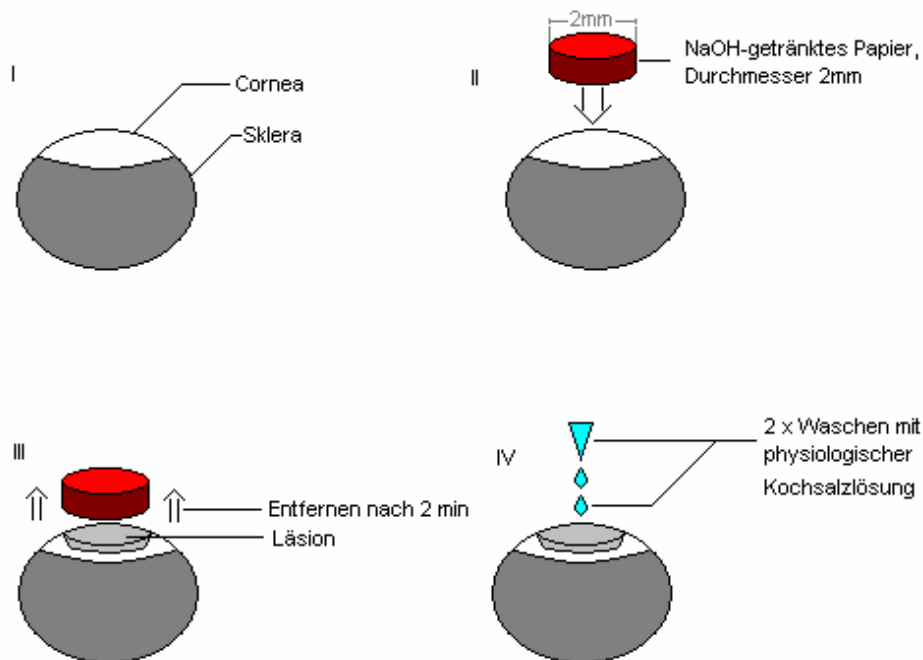
Um den Anteil der vitalen Zellen an den transplantierten Zellen zu ermitteln, wurde eine solche Färbung durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe von 40 µl aus dem Zellpool entnommen und mit 5 µl 0,4% Trypanblau versetzt. Die Probe wurde sofort

in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die Anzahl der lebenden Zellen (ungefärbt) bestimmt. Es wurden 3 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Der ermittelte Wert wurde nun zur Zellzahl ins Verhältnis gesetzt und als Prozentsatz vitaler Zellen beschrieben. Zur weiteren Verwendung wurde die Zellzahl auf 1000 lebende Zellen je  $\mu\text{l}$  eingestellt.

### 3.3. Makroskopischer Versuch

#### 3.3.1. Setzen der Läsionen

48 vierwöchige weibliche Balb-C-Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (90 mg/kg KG) sowie Rompun (6 mg/kg KG) narkotisiert. Anschließend wurden mit 0,1 M NaOH-getränkte Papierplättchen (Whatman, Durchmesser 2 mm) bilateral definierte kombinierte Epithel- und Stromaläsionen gesetzt, indem die Papierplättchen über 2 min belassen wurden (Abb. 7). Diese Methode wurde modifiziert nach Cao et al. durchgeführt (9).

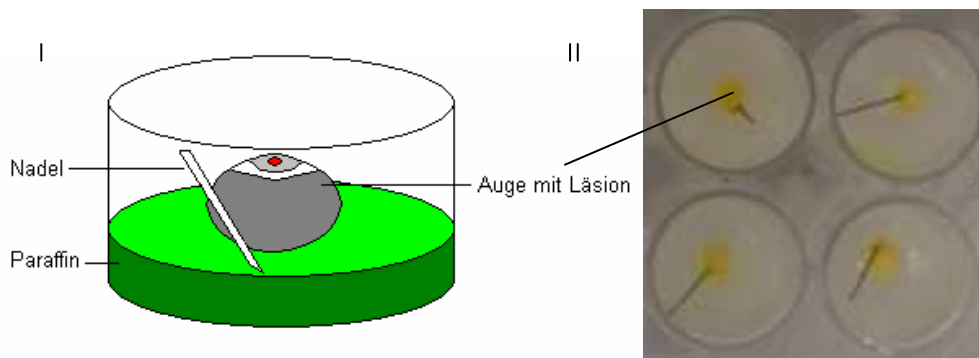


**Abb. 7. Prinzip der Methode zur standardisierten Verletzung der Hornhautoberfläche.**

I) Normales Auge. II) Laugengetränktes Papier mit einem Durchmesser von 2 mm wird zentral auf die Kornea gegeben. III) Nach 2 min wird das Papier entfernt, eine scharf umgrenzte Läsion ist auf der

Hornhaut zu sehen. IV) Um evtl. vorhandene Restlauge zu entfernen, wird das Auge mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die Augen wurden nun mit einem Tropfen Conjuncaïn EDO analgesiert. Über 6 h erfolgte eine Beobachtung der Tiere. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere durch Genickbruch in Isofluran-Narkose getötet, die Augen entnommen und entsprechend den definierten Gruppen in 24-Well-Zellkulturschalen mittels steriler Sterican-Kanülen 27Gx3/4" so fixiert, daß die Hornhaut nach oben zeigte. Dies ist in Abbildung 8 dargestellt. Der Boden der Kulturschalen wurde mit Paraffin ausgegossen, um eine sichere Verankerung zu ermöglichen.



**Abb. 8. Darstellung der Organkultur.**

I) Schematische Darstellung der Organkultur (seitlich). Die Augen sind mit Nadeln am Paraffinboden fixiert. Eine Lageänderung der Organe in Kultur kann so weitgehend verhindert werden. Dadurch werden Winkelverschiebungen der Hornhäute zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten vermieden. II) Photographie der Augen in der Kulturschale (von oben). Durch Fluoreszeïn erschienen die Augen gelblich.

Fluoreszeïn wurde auf die Augen aufgetropft, um die Größe der Läsionen photographisch mittels eines Blaufilters zu dokumentieren.

Die Augen wurden zufällig in 3 Gruppen eingeteilt. 27 Augen bildeten die Stammzellgruppe (SZ), 30 Augen die Knochenmark- (KM) und 33 Augen die Kontrollgruppe (KO).

#### 3.3.2. Auftragen der Zellen

Auf die Läsionen wurden nun entsprechend der Gruppen 25000 Vybrant™-CFDA SE-markierte CD117+-HSC, 25000 Vybrant™-CFDA SE-markierte

Knochenmarkzellen oder Stammzellmedium mit jeweils gleichem Volumen (25 µl) hinzugegeben. Mit 500 µl Hornhautmedium wurde das Volumen anschließend aufgefüllt, um eine vollständige Immersion der Augen in Medium zu erreichen. Dieser Schritt erfolgte initial 6 h nach Läsion und wurde zu den Zeitpunkten 12 h und 16 h post läsionem wiederholt. Zu den folgenden Zeitpunkten wurde jeweils 525 µl Hornhautmedium hinzugegeben. In Tabelle 2 ist der zeitliche Verlauf des Versuchs schematisch dargestellt.

<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>									
	Therapiezeitraum			Beobachtungszeitraum						
0h-6h	6h	12h	16h	20h	24h	36h	48h	60h	72h	85h
KO	25 µl Stammzellmedium + 500 µl Hornhautmedium	25 µl Stammzellmedium + 500 µl Hornhautmedium	25 µl Stammzellmedium + 500 µl Hornhautmedium	Jeweils 525 µl Hornhautmedium						
KM	25 µl Knochenmark + 500 µl Hornhautmedium	25 µl Knochenmark + 500 µl Hornhautmedium	25 µl Knochenmark + 500 µl Hornhautmedium	Jeweils 525 µl Hornhautmedium						
SZ	25 µl CD117+-HSC + 500 µl Hornhautmedium	25 µl CD117+-HSC + 500 µl Hornhautmedium	25 µl CD117+-HSC + 500 µl Hornhautmedium	Jeweils 525 µl Hornhautmedium						

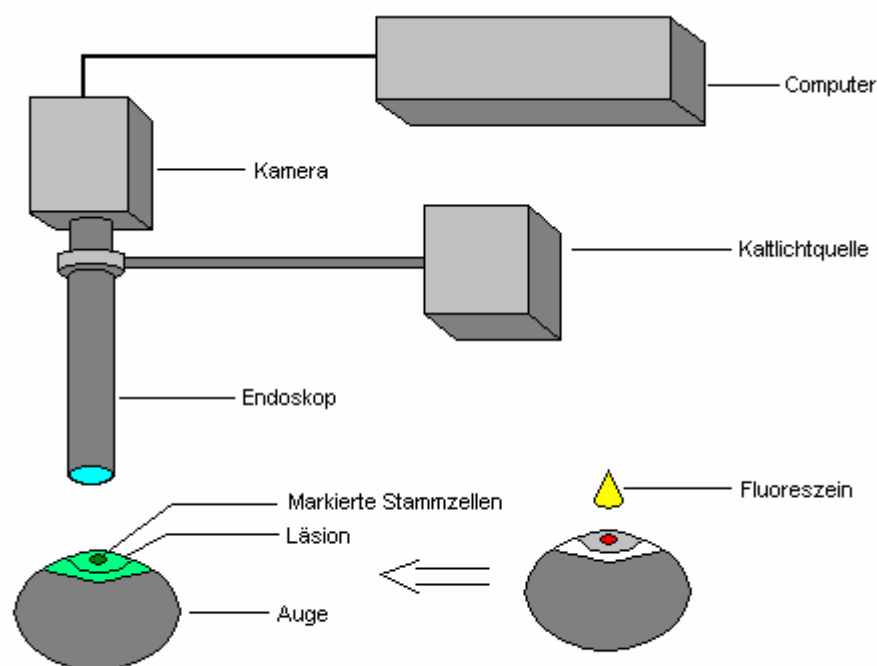
**Tabelle 2. Schematischer Aufbau des Versuchs.**

Die Augen wurden zunächst ohne Therapie 6 h *in vivo* belassen. Nach E nukleation der Augen wurde der Versuch *in vitro* weitergeführt. Zu den Zeitpunkten 6, 12 und 16 h wurden entsprechend der Gruppen 25 µl Stammzellmedium, 25 µl Knochenmark oder 25 µl CD117+-HSC appliziert und mit 500µl Hornhautmedium ergänzt (Therapiezeitraum). Knochenmark und CD117+-HSC waren in Stammzellmedium suspendiert. Die Konzentration der Zellen betrug 1000/µl. Im Beobachtungszeitraum wurden die Augen aller drei Gruppen mit jeweils 525 µl Hornhautmedium überschichtet. Die Größe der Läsionen wurde zu jedem Zeitpunkt vor Applikation der Zellen bzw. frischen Mediums nach Fluoreszeinfärbung photodokumentiert.

**3.3.4. Verlaufsbeobachtung**

Nach Entnahme der Augen und Fixation in den Schalen (Zeitpunkt  $t_1=6$  h) wurden 4 l Fluoreszein auf die Hornhäute aufgetropft und die Größe der Läsion photographisch bestimmt (Abb.9). Im Anschluß wurde das Fluoreszein mit 100 µl PBS ausgewaschen und abpipettiert. Zu den Zeitpunkten  $t_2=12$  h und  $t_3=16$  h wurden entsprechend der jeweiligen Gruppen CD117+-HSC, Knochenmark oder Stammzellmedium sowie 500 µl Hornhautmedium hinzugegeben. Zu den späteren Zeitpunkten  $t_4-t_{10}$  (20 h – 84 h) wurden alle Gruppen mit 525 µl Hornhautmedium

behandelt. Es erfolgte eine Dokumentation von 10 Zeitpunkten ( $t_{1-10}$  = 6 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h und 85 h). Da die Organe in Kulturschalen mit ungleich hohem Paraffinboden gehalten wurden, musste die Kamera bei jedem Photo auf jedes Auge neu eingestellt werden. Daraus resultierten Unterschiede in der Ausleuchtung, welche mittels digitalem Bildabgleich weitestgehend eliminiert werden konnten. Trotz planer Aufnahmetechnik waren leichte Winkelverschiebungen der einzelnen Bilder nicht vermeidbar. Durch die Normierung der Ulkusfläche gegen die sichtbare Hornhautfläche wurde dieser Fehler minimiert.



**Abb. 9. Makroskopische Datenerhebung.**

Zunächst wird das Medium aus den Kulturschalen entnommen. Nach Auftropfen von Fluoreszein wird im Blaulicht des Endoskops die Hornhautläsion photographiert. Die Augen werden mit PBS gewaschen und frisches vorgewärmtes Medium wird hinzugegeben. Anschließend kann am Computer die Fläche der Läsionen ermittelt werden.

#### 3.3.5. Makroskopische Auswertung

Die photographisch dokumentierten Läsionen wurden mit dem Programm SigmaScan<sup>®</sup> Pro 5 (SSPS Inc.) ausgewertet. Die Bilder wurden rechentechnisch in

ihrer Größe aufeinander abgeglichen, um Beeinflussungen durch Fokussierungsschwankungen der Kamera zu reduzieren. Außerdem wurden die Läsionen ins prozentuale Verhältnis gegenüber der sichtbaren Hornhautoberfläche gesetzt, um etwaige Winkelverschiebungen auszugleichen.

Die Größe der Läsionen wurde jeweils dreifach gemessen und der Mittelwert der ermittelten Flächen gebildet. Anschließend wurden die Flächen innerhalb der Gruppe zu dem jeweiligen Zeitpunkt miteinander verglichen. Des Weiteren wurden die Daten innerhalb der einzelnen Gruppen miteinander verglichen, um so die Variabilität der Heilungsgeschwindigkeit darzustellen. Statistische Analysen wurden mit dem Programm SPSS 8.0 (SSPS Inc.) durchgeführt.

Anschließend wurden die Augen aus den Kulturschalen entnommen und histologisch untersucht.

#### 3.4. Histologische Auswertung

##### 3.4.1. Verarbeitung der Gewebe

Die Augen wurden über Nacht in 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Danach erfolgte das Auswaschen der Fixierlösung unter fließendem Leitungswasser. Die Organe wurden anschließend über eine aufsteigende Propanolreihe (12 h in 50% Propanol, 2 h in 70% Propanol, 1 h in 96% Propanol, 1 h in 100% Propanol) entwässert, in Paraffin eingebettet und zum Schneiden aufgeblickt.

An einem Mikrotom (Fa. Leica) wurden 5 µm-Schnitte der Augen angefertigt. Diese wurden auf doppelt silanisierte Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden bei +4°C im Kühlschrank unter Lichtausschluß bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Anschließend wurden die Färbungen durchgeführt.

Histologische Untersuchungen bezüglich des Epithelaufbaus, der Verteilung Vybrant™-CFDA SE-positiver Zellen sowie immunhistologische Schnitte mit Färbung auf Cytokeratin 3/12 (CK 3/12) und CD117 wurden angefertigt.

##### 3.4.2. Immunhistochemie

Immunfärbungen basieren auf der Anwendung spezifischer Antikörper gegen bestimmte Antigene.

Zuerst werden unspezifische Bindungsstellen der Gewebe mit Normalserum geblockt. Anschließend wird die Probe (bzw. das Präparat) mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Die Antikörper binden an das jeweils spezifische Antigen. Je nach Antikörper wird nun wie folgt verfahren: Bei markierten Antikörpern kann das Präparat nach einem Waschgang (zur Entfernung überschüssigen Antikörpers) eingebettet und ausgewertet werden. Bei nichtmarkierten Antikörpern muß eine Darstellung mit der sogenannten Sandwich-Methode erfolgen. Dazu wird ein zweiter Antikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet und mit einer Markierung oder einem Enzym gekoppelt ist, auf das Präparat gegeben. Dieser Antikörper bindet nun an den ersten Antikörper. Ist der Sekundärantikörper mit einem Farbstoff markiert, kann die Färbung abgeschlossen werden, ist er mit einem Enzym markiert, wird die Enzymreaktion durchgeführt. Dabei werden zugegebene Substrate



in Farbstoffe umgewandelt, die dann mikroskopisch dargestellt werden können. Mehrfachfärbungen sind bei allen genannten Methoden möglich.

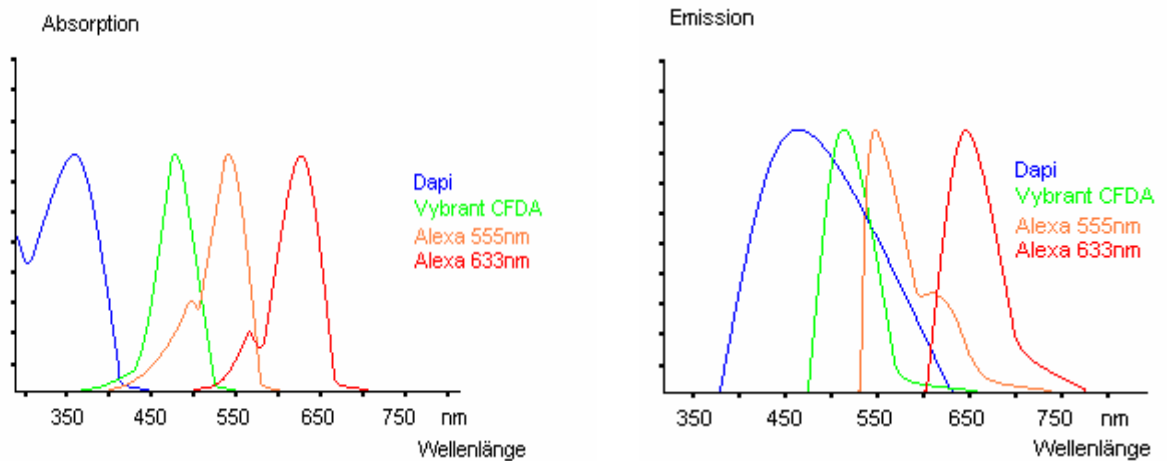
#### **3.4.3. Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Eigenschaft verschiedener Substanzen (Fluorochrome), welche durch die Aufnahme von Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden können (Absorption) und daraufhin Licht definierter Frequenzen emittieren (Emission). Man unterscheidet Primärfluoreszenz (auch Eigenfluoreszenz) und Sekundärfluoreszenz (erst nach Behandlung mit Fluorochromen). Bei letzterer unterscheidet man direkte Färbungen und indirekte Färbungen. Bei direkten Färbungen werden die Gewebe mit fluoreszierenden Farbstoffen, z.B. DAPI oder Vybrant™-CFDA SE-Zelltracer behandelt. Eine Sonderform der direkten Fluoreszenz ist die induzierte Fluoreszenz, bei welcher nichtfluoreszierende körpereigene Stoffe durch Behandlung zu Fluorophoren umgewandelt werden. Bei indirekten Färbungen werden die Farbstoffe an spezifische Träger wie z.B. Antikörper fixiert, die sich dann an das Gewebe binden.

Werden Fluorochrome in die gewünschten Objekte (Zellen oder Gewebe) eingebracht, kann man nach Anregung die emittierten Frequenzen am Mikroskop darstellen. Meist wird mittels UV-Lampen ein breites Anregungsspektrum angelegt, welches durch nachgeschaltete Filterblöcke in die gewünschten Partitionen aufgetrennt wird. Der schematische Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes ist in Abbildung 11 gezeigt.

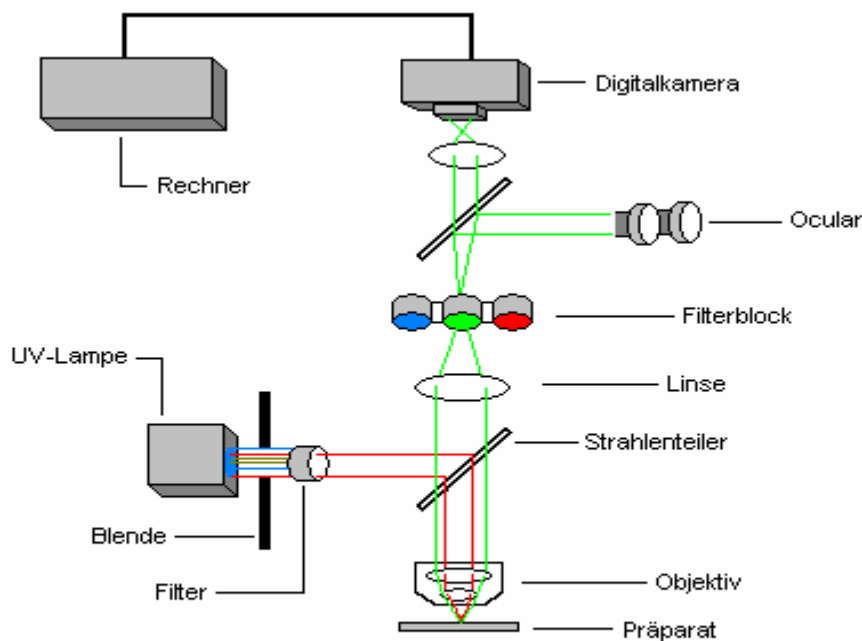
Das gefärbte Objekt wird so angeregt und die im Präparat vorhandenen Fluorochrome emittieren in ihren jeweiligen Emissionsspektren.

Die verschiedenen Emissionen können nun im Strahlengang durch Filter erneut aufgetrennt werden, um so die gewünschten Strukturen darzustellen. Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Färbungen sind in Abbildung 10 dargestellt.



**Abb. 10. Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome.**

Werden geeignete Filter und Fluorochromen gewählt, können an einzelnen Präparaten und Zellen mehrere Eigenschaften (wie z.B. Vybrant™-CFDA SE, CD117 und CK 3/12) gleichzeitig dargestellt werden.



**Abb. 11. Schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes.**

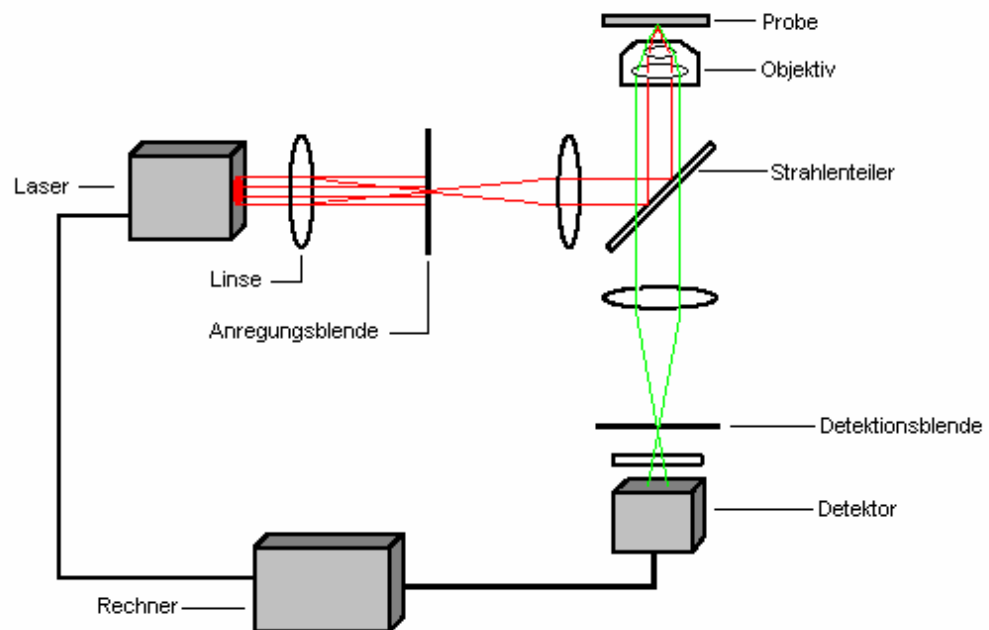
In einer UV-Lampe wird ein breites Spektrum an UV-Licht erzeugt. Über Filter und Strahlenteiler wird dieses Licht auf das Präparat gelenkt. Die im Präparat enthaltenen Fluorochromen absorbieren das Licht und werden dadurch angeregt. Sie emittieren nun Licht in ihrem jeweiligen Emissionsspektrum. Durch den Strahlenteiler gelangt das emittierte Licht zu einem Filterblock, der nur Licht bestimmter Wellenlängen hindurchlässt. Das durchgelassene Licht ergibt ein Bild, welches vom Betrachter ausgewertet werden kann.

#### **3.4.4. Grundlagen der Konfokalmikroskopie**

Das Konfokalmikroskop (engl. CLSM, confocal laser scanning microscope) ist ein Lichtmikroskop, welches optisch mikroskopische Schnitte in dreidimensionalen Strukturen (Gewebe) erzeugen kann. Durch Datenverarbeitung in einem Computer können diese Schnitte zu einer räumlichen Darstellung zusammengefügt werden (Abb.12).

Wird am Lichtmikroskop normalerweise durch Überlagerung der lichtoptisch scharf eingestellten Ebene durch anliegende Ebenen die Auflösung herabgesetzt (verwaschen), so ermöglicht das Konfokalmikroskop die Darstellung nur einer Schnittebene. Dabei wird das Licht auf einen Punkt in dieser Ebene fokussiert und durch Verschieben des Punktes eine ganzheitliche Darstellung der Ebene ermöglicht. Licht außerhalb der gewünschten Ebene wird durch eine Lochblende (Pinhole) unterdrückt. Damit reduziert sich die Unschärfe. Durch diese Technik lassen sich hochauflösende dreidimensionale Bilder generieren (Auflösung bis 200 nm Objektgröße).

Durch Verwendung verschiedener Laser und Blenden können vor allem Fluoreszenzmehrfachmarkierungen mit höchster Genauigkeit dargestellt werden. Aus den gewonnenen Datensätzen lassen sich die jeweils gewünschten Informationen herausfiltern. Die Lichtfrequenzen können durch Masken (ähnlich wie Filter bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie) auf die gewünschten Spektren reduziert werden.



**Abb. 12. Schematischer Aufbau des Konfokalmikroskopes.**

Ein Laserstrahl wird auf das Präparat geleitet und erregt die Fluorochromen. Diese emittieren Licht in ihrem individuellen Spektrum. Das emittierte Licht wird zum Detektor geleitet. An der Detektionsblende kann das sogenannte „Pinhole“ eingestellt werden. Das „Pinhole“ erlaubt es, nur eine bestimmte Ebene innerhalb des Präparats scharf einzustellen, andere Ebenen werden bei der Darstellung der Daten herausgerechnet. Damit lassen sich der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie an Schärfe überlegene Bilder gewinnen.

#### 3.4.5. HE-Färbung (Hämalaun-Eosin)

Die HE-Färbung erfolgte nach einem in der Routinediagnostik verwendeten Standardprotokoll unter weitgehendem Lichtauschluss:

Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe:

Xylol 1 100%	10 min
Xylol 2 100%	10 min
Ethanol 100%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 70%	5 min
Ethanol 50%	5 min
Aqua dest.	15 sec

Färben:

Hämalaun	4 min
Bläuen in Leitungswasser	10 min
Eosinlösung 1%	30 sec
Ethanol 50%	10 sec
Ethanol 70%	10 sec
Ethanol 96%	10 sec
Ethanol 100%	10 sec
Isopropanol 100%	10 sec
Xylol 1 100%	10 min
Xylol 2 100%	10 min

Eindecken

#### **3.4.6. Immunfärbung auf CD117**

Die Immunfärbung auf CD117 wurde nach der Sandwich-Methode durchgeführt, d.h. die Schnitte wurden erst mit dem polyklonalen Primärantikörper rabbit anti-mouse CD117 (Verdünnung 1:200) markiert und dieser anschließend mit dem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa™ 633 nm (Verdünnung 1:500) dargestellt. Als Kerngegenfärbung wurde DAPI verwendet. Die Vorinkubation erfolgte mit Ziegen-Normalserum zum Blocken der unspezifischen Bindungen.

Protokoll:

0,2% Tween 20	10 min
20% Ziegen-Normalserum in PBS	20 min
0,2% Tween 20	10 min
0,2% Tween 20	10 min
Primärantikörper 1:200	120 min
0,2% Tween 20	10 min
0,2% Tween 20	10 min
Sekundärantikörper 1:500	120 min
0,2% Tween 20	10 min
0,2% Tween 20	10 min

1 µg/ml DAPI	5 min
0,2% Tween 20	10 min
0,2% Tween 20	10 min

Einbetten in Glycin.

Fixierung des Randes mit Nagellack (zum Vermeiden von Austrocknung).

#### **3.4.7. Immunfärbung auf Cytokeratin 3/12**

Die Immunfärbung auf CK 3/12 wurde ebenfalls nach der Sandwich-Methode durchgeführt. Die Primärmarkierung erfolgte mit dem monoklonalen mouse anti-Cytokeratin 3/12 Antikörper (Verdünnung 1:100), als Sekundärantikörper wurde der fluoreszenzmarkierte goat-anti-mouse Antikörper (Alexa™ 555 nm, 1:500) verwendet. Die Blockung erfolgte mit Ziegen-Normalserum und die Kerngegenfärbung mit DAPI.

#### **3.4.8. Fluoreszenzmikroskopie**

An einem Fluoreszenzmikroskop der Marke Olympus BH2RFCA wurden bei 200- und 400-facher Vergrößerung mit der Software Visitron spot advanced digitale Bilder der gefärbten Präparate angefertigt. Zur Darstellung der Färbungen wurden folgende Filter verwendet: BP 495 FIT-C, LP F11-007 533/50, F 151 006.

Die gewonnenen Bilder wurden miteinander verglichen und die Verteilung der markierten Stamm- und Knochenmarkszellen hinsichtlich Vybrant™-CFDA SE und die Expressionsmuster bezüglich CD117 und CK 3/12 untersucht.

#### **3.4.9. Konfokalmikroskopie**

Da bei herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie die Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulären Strukturen durch die technisch bedingten Überlagerungseffekte nur begrenzt möglich war, wurden mit einem Konfokalmikroskop ergänzende Bilder der Präparate angefertigt. Die Trennfilter wurden bei 535 nm und 610 nm gesetzt. Die Präparate wurden auf die Expression von CK 3/12, CD117 und die Fluoreszenz entsprechend Vybrant™-CFDA SE untersucht.

### 4. Ergebnisse

#### 4.1. Lokal applizierte CD117-positive hämatopoetische Stammzellen und lokal applizierte Knochenmarkzellen erhöhen die Heilungsrate kornealer Epithelläsionen.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von lokal applizierten CD117+-HSC und Knochenmarkzellen auf die korneale Wundheilung zu untersuchen. Standardisierte Hornhautläsionen wurden in einem *in-vivo/ in-vitro*-Modell zu drei Zeitpunkten mit CD117+-HSC, Knochenmarkzellen und Stammzellmedium behandelt. Es erfolgte eine Nachbeobachtung über 85 h. Die Läsionen wurden an 10 Zeitpunkten photographisch dokumentiert und mit dem Programm SigmaScan<sup>®</sup> ausgewertet. Die Heilungsrate, Heilungszeit und Heilungsgeschwindigkeit wurden bestimmt. Anschließend wurden die Organe immunhistologisch untersucht.

Um den Effekt von CD117+-HSC und Knochenmarkzellen auf die Heilungsrate der Epithelläsionen zu bestimmen, wurden die Ulcera 0, 6, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72 und 85 h nach E nukleation der Augen mit Fluoreszein angefärbt und photographiert. Eine Hornhaut wurde als abgeheilt angesehen, sobald sich mit Fluoreszein kein Ulkus mehr darstellen ließ. Endpunkt der Analyse war die Abheilung im Beobachtungszeitraum von 85 h.

Zunächst wurden die Gruppen mittels ANOVA-Analyse miteinander verglichen. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Zur genaueren Analyse wurde der gepaarte Student's t-Test angewendet.

Eine komplette Abheilung der Läsionen erfolgte im Beobachtungszeitraum von 85 h in 100% (27/27) der Stammzellgruppe (SZ), in 95,67% (29/30) der Knochenmarkgruppe (KM) und in 66,67% (22/33) der Kontrollgruppe (KO). Die statistische Analyse ergab sowohl für SZ als auch für KM gegenüber KO einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,005$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen SZ und KM konnte nicht festgestellt werden ( $p = 0,89$ ).

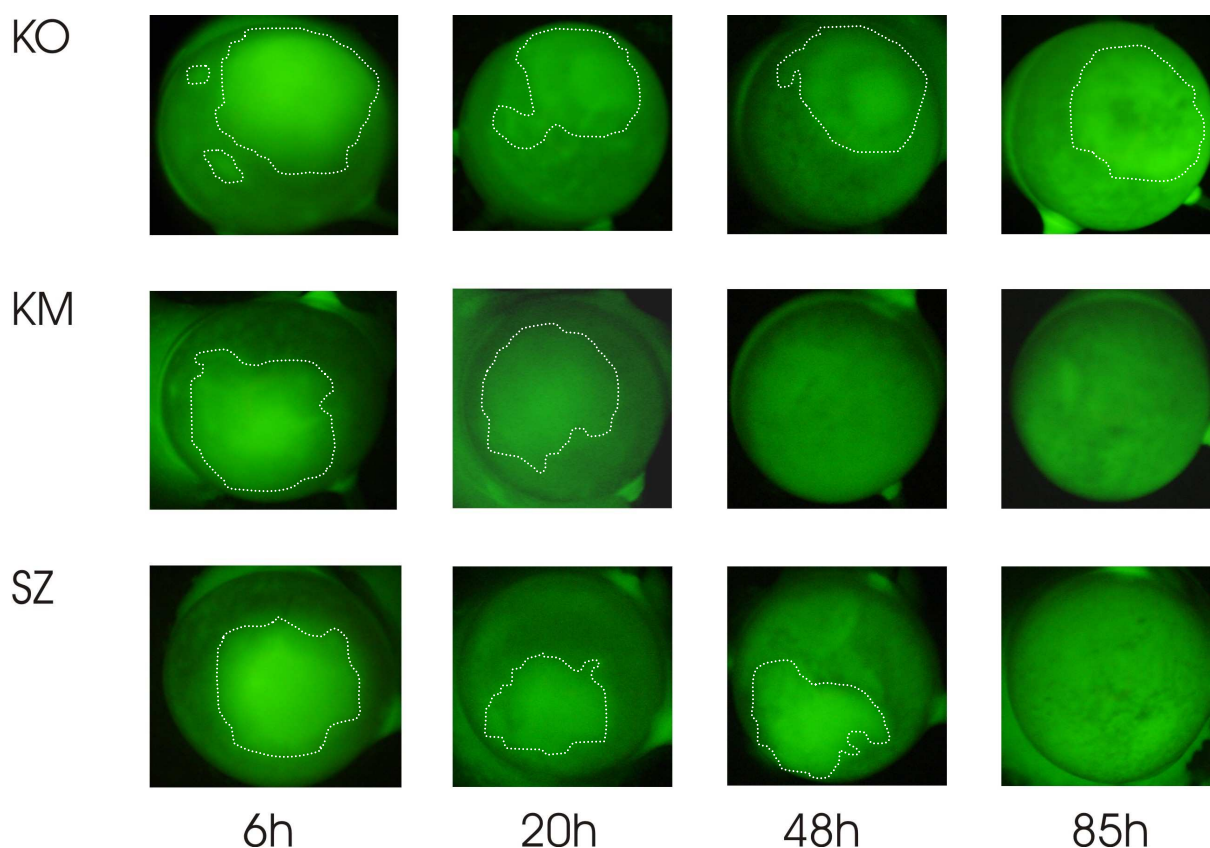
Daraus lässt sich schlussfolgern, dass im verwendeten Modell sowohl CD117+-HSC als auch Knochenmarkzellen einen positiven Effekt auf die Heilungsrate der kornealen Ulcera ausüben. Ein Unterschied der Heilungsraten zwischen den Gruppen SZ und KM besteht nicht.

### 4.2. CD117+-hämatopoetische Stammzellen und Knochenmarkzellen beschleunigen die korneale Wundheilung.

Um den Effekt der applizierten CD117+-HSC bzw. der applizierten Knochenmarkzellen auf die Heilungsdauer der Läsionen zu analysieren, wurden nun mittels der Software SigmaScan<sup>®</sup> die sichtbaren Hornhautoberflächen zu jedem Untersuchungszeitpunkt ausgemessen. Die Messung wurde dreifach durchgeführt, um die Messgenauigkeit zu erhöhen. Nach klinischen Gesichtspunkten erfolgten die Messungen der jeweiligen fluoreszeinangefärbten Ulkusoberfläche ebenfalls dreifach (Abb. 13). Die Mittelwerte der Messungen wurden gebildet und für die weitere statistische Analyse verwendet.

Die gemessenen Ulcera wurden in Relation zur respektiven Hornhautoberfläche gesetzt. Die erste gemessene Läsion wurde als Ausgangspunkt angesehen und als 1,0 definiert. Die jeweiligen Folgewerte wurden nun als Bruchteil des Ausgangswertes bestimmt. Die Abheilung entsprach somit der Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Folgewert. Zu jedem weiteren Zeitpunkt wurde der aktuelle Wert als Bruchteil des vorhergehenden definiert (Beispiel: Ulkus 6 h = 1,0. Ulkus 12 h = 0,5. Abheilung =  $(1,0-0,5) \times 100\% = 50\%$ . Ulkus 12 h = 0,5. Ulkus 16 h = 0,25. Abheilung =  $(0,25/0,5-0,25) \times 100\% = 50\%$ ) Mittels der Software SPSS<sup>™</sup> 8 konnten die Heilungszeiten nach Kaplan-Meier und die entsprechenden Signifikanzen als log-rank ermittelt werden. Die Analyse nach Kaplan-Meier (Überlebenszeitanalyse) besagt, dass ein Ereignis (in diesem Fall die Abheilung des Ulkus) zu einem ex ante unbekanntem Zeitpunkt eintritt und nicht notwendigerweise im Beobachtungszeitraum erfolgt. Tritt die Abheilung innerhalb des Untersuchungszeitraumes auf, ist der Wert unzensiert, erfolgt sie später, gilt der Wert als zensiert. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit der Abheilung anhand der vorherigen Abheilungswahrscheinlichkeiten ermittelt (103).





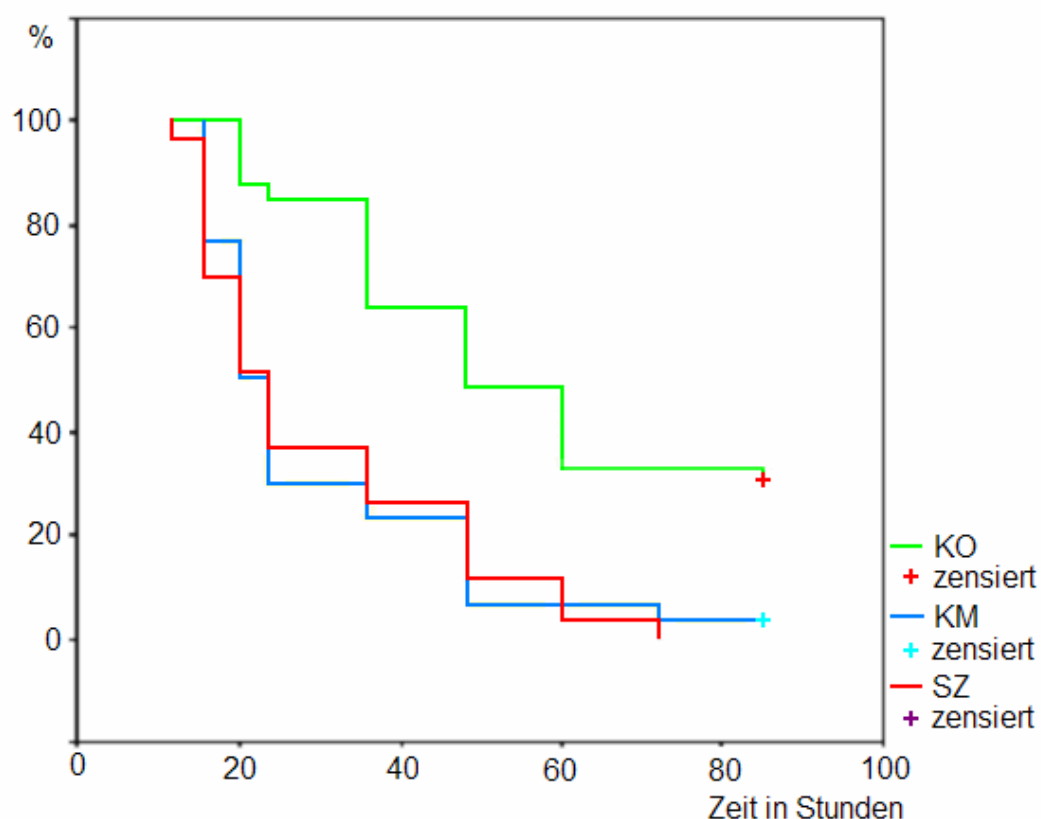
**Abb. 13. Representative makroskopische Photographien der untersuchten Mauseugen zur Auswertung der Epithelläsionen zeigen einen klaren Unterschied zwischen den Gruppen.**

Die fluoreszenzgefärbten Augen der verschiedenen Gruppen KO, KM und SZ sind entsprechend der zeitlichen Abfolge dargestellt. Die Ulcera stellen sich hellgrün dar. Zur besseren Darstellung wurden die Ulcera weiß umrandet. Die umrandete Ulcusfläche wurde mit dem Programm SigmaScan<sup>®</sup> ausgemessen. Die Werte der ermittelten Ulcusflächen wurden zu den sichtbaren Hornhautoberflächen ins Verhältnis gesetzt, um die Heilungsgeschwindigkeit zu berechnen.

KO, Kontrollgruppe; KM, Knochenmarkgruppe; SZ, Stammzellgruppe.

Die mittlere Heilungszeit betrug für die SZ  $29,5 \pm 17,19$  h, für die KM  $30,07 \pm 16,45$  h und für die KO  $55,48 \pm 23,77$  h (Abb. 14). Dies entspricht für SZ 53,17% und für KM 54,2% der mittleren Heilungsdauer der KO. Der Unterschied zur KO war sowohl für SZ als auch KM hochsignifikant (log-rank-Test:  $p < 0.0001$ ).

Dies besagt, dass die lokale Applikation von CD117<sup>+</sup>-HSC bzw. von Knochenmark die Heilungsdauer kornealer Wunden signifikant (um 46,83% respektive 45,8%) verkürzt.



**Abb. 14. Die Läsionen der Stammzell- und Knochenmarkgruppe heilen schneller als in der Kontrollgruppe.**

In dieser Abbildung ist die Analyse nach der Kaplan-Meier-Methode (Abheilungskurve) der jeweiligen Gruppen dargestellt. Jede Stufe entspricht der Abheilungsrate zum Untersuchungszeitpunkt, die Höhe der Stufe zeigt den Anteil noch nicht abgeheilter Hornhäute. Horizontal kann die Zeitdifferenz der Abheilung zwischen den verschiedenen Gruppen bestimmt werden.

In der SZ (rot) ist eine komplette Abheilung erfolgt. In der KM (blau) wurde ein Wert zensiert (blaues Kreuz), da die Läsion im Beobachtungszeitraum nicht abgeheilt war. In der KO (grün) wurden mehrere Werte zensiert (rotes Kreuz), weil eine komplette Abheilung nicht erfolgte. Die Analyse nach Kaplan-Meier zeigt einen klaren Unterschied zwischen KM, SZ und KO bezüglich der Abheilungszeit.

#### **4.3. Die Heilungsgeschwindigkeit kornealer Wunden wird von CD117+-HSC und Knochenmarkzellen beschleunigt und verläuft im verwendeten Modell zweiphasig.**

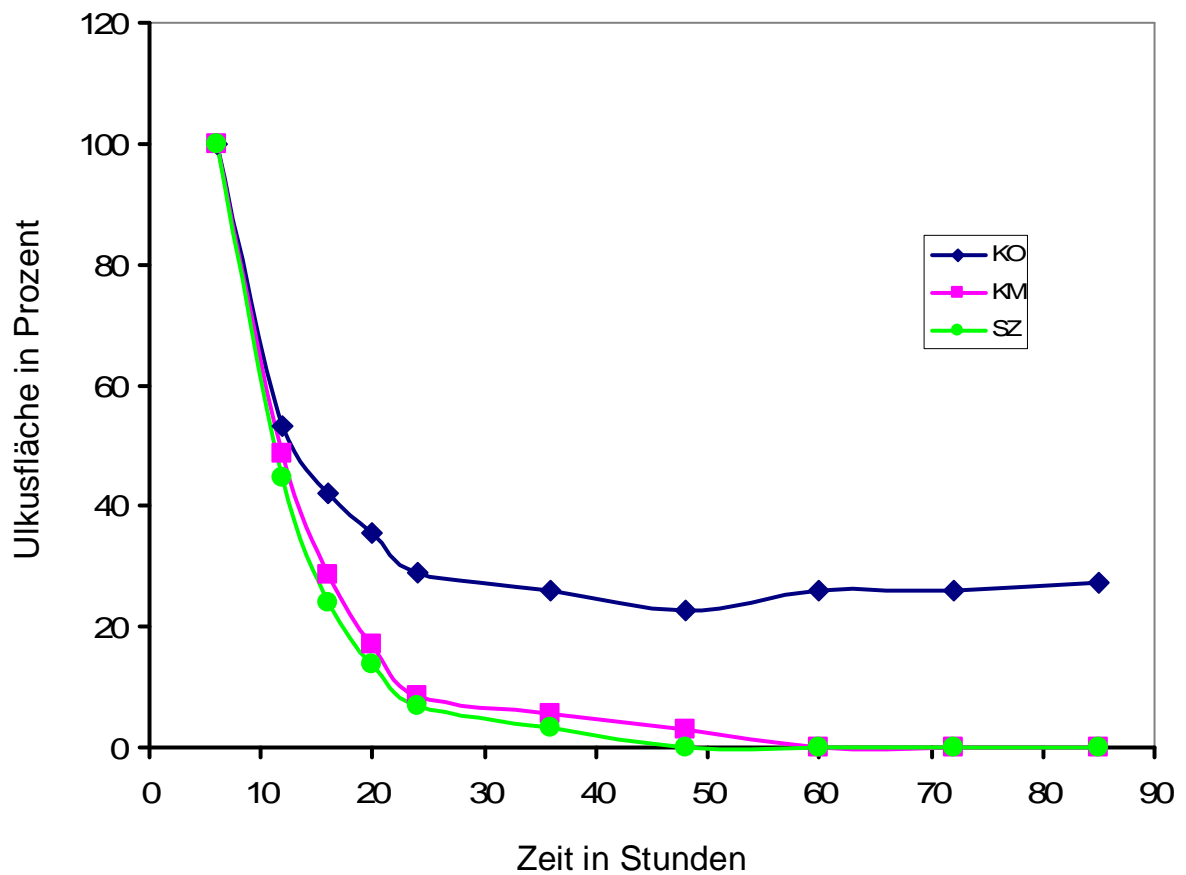
Zur Analyse der Heilungsgeschwindigkeiten der Ulcera wurde die relative Heilung gegenüber dem jeweiligen Vorwert über die Zeit nach der Formel  $V_n = (A_n - A_{n+1}) / (t_{n+1} - t_n)$  ( $V_n$ =Geschwindigkeit,  $A_n$ =Fläche,  $t_n$ =Zeit) berechnet. Beispiel: Betrag die Fläche

des Ulkus zum Zeitpunkt  $t_n=6$  h  $A_n=100\%$  und zum Zeitpunkt  $t_{n+1}=12$  h  $A_{n+1}=50\%$ , berechnete sich die relative Heilungsgeschwindigkeit [ $V_n=(100\%-50\%)/(12\text{ h}-6\text{ h}) = 50\%/6\text{ h} = 8,33\%/h$ ]. Die drei Gruppen wurden bezüglich der Heilungsgeschwindigkeit mit ANOVA verifiziert und anschließend mit dem gepaarten Student's t-Test auf Signifikanz überprüft.

Während des anfänglichen Therapiezeitraumes  $t_{1-4}$  (6-20 h) erfolgte eine dreimalige Applikation von CD117+-HSC, Knochenmarkzellen bzw. Stammzellmedium. Im Beobachtungszeitraum  $t_{4-10}$  (20-85 h) hingegen wurden die Hornhäute aller drei Gruppen im Hornhautmedium nachbeobachtet.

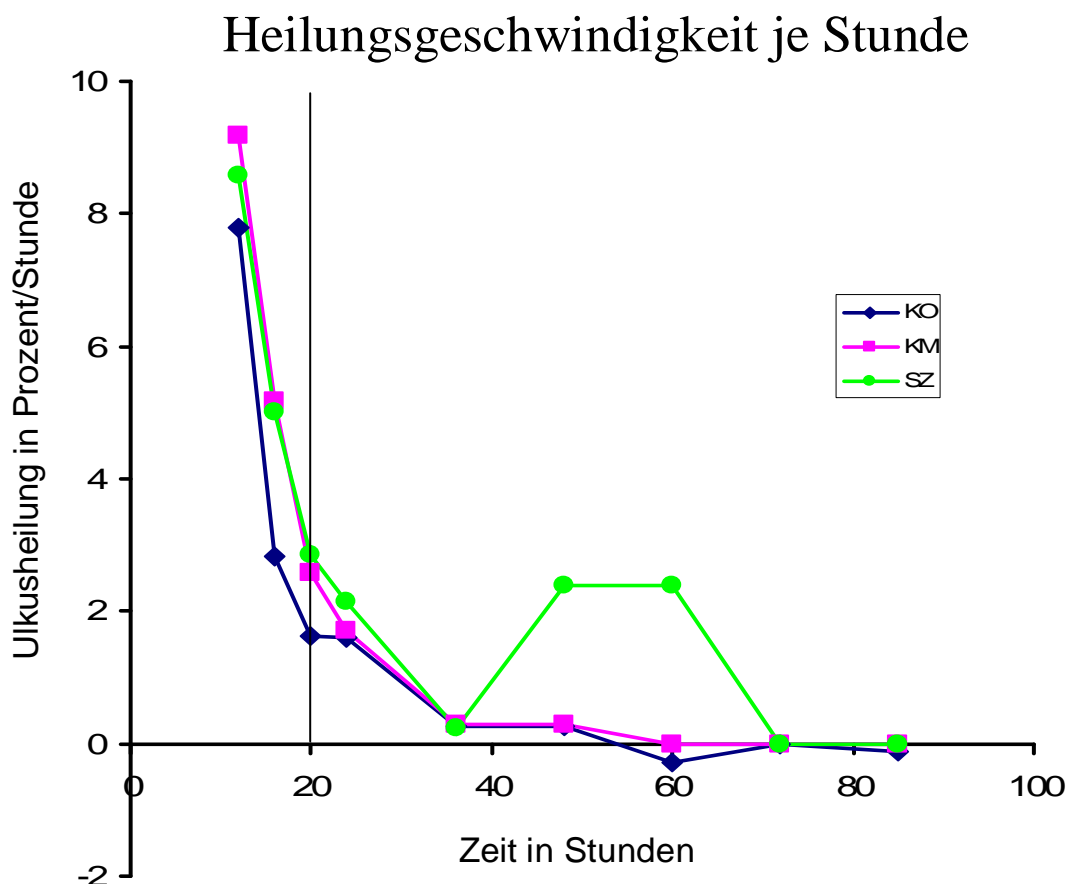
Um zu überprüfen, ob ein Unterschied der Heilungsgeschwindigkeiten innerhalb der Gruppen zwischen dem Therapie- und Beobachtungszeitraum bestand, wurden diese Zeiträume miteinander verglichen.

Die mittlere Heilungsgeschwindigkeit ( $V_{mt}$ ) im Therapiezeitraum  $t_1=6$  h bis  $t_4=20$  h betrug für die KO 4,08%/h, für die KM 5,47%/h und für die SZ 5,65%/h, was einem Benefit gegenüber den Kontrollaugen von 34,06% (1,39%/h) in der KM und von 38,48% (1,57%/h) in der SZ entspricht (Abb.15, Abb.16).



**Abb. 15.** Die lokale Applikation von CD117+-HSC und Knochenmarkzellen führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer schnelleren Abheilung der Ulkusflächen.

Im Diagramm sind die prozentualen Mittelwerte der Ulkusflächen über die Zeit aufgetragen. Ab dem dritten Untersuchungszeitpunkt bei  $t=16$  h stellt sich ein klarer Vorteil der SZ und KM gegenüber der KO dar ( $p<0,05$ ). In der KO zeigt sich ein Anstieg der mittleren Ulkusfläche im Sinne eines persistierenden Defektes der nicht abgeheilten Hornhäute nach dem Zeitpunkt  $t=48$  h.



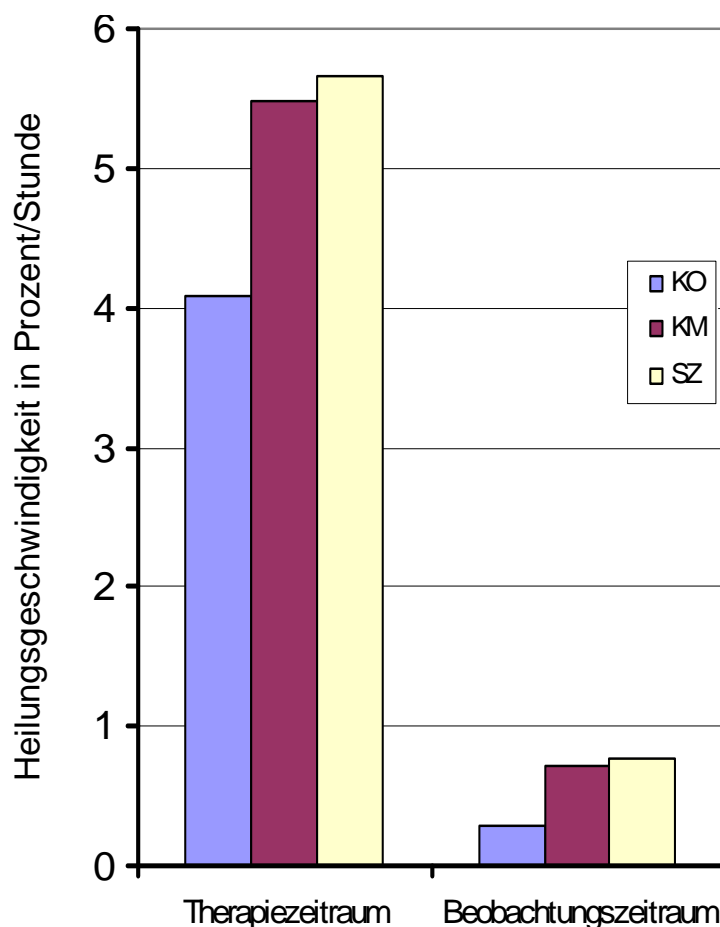
**Abb. 16. Ein anhaltender Effekt der applizierten CD117+-HSC auf die Heilungsgeschwindigkeit kornealer Wunden ist nach beendeter Therapie nachweisbar.**

Das Diagramm zeigt die mittlere prozentuale Heilungsgeschwindigkeit je Stunde im Therapie- und Beobachtungszeitraum. Die senkrechte Linie (bei  $t=20$  h) trennt die beiden Zeiträume voneinander. Die Heilungsgeschwindigkeit sinkt initial in allen drei Gruppen. Nach dem vierten Messpunkt ( $t=20$  h) und beendeter Therapie erfolgt eine weitere Reduktion der Heilungsgeschwindigkeiten in den Gruppen KM und KO, nicht jedoch SZ (nach einem Mindestwert bei 36 h). Die Heilungsgeschwindigkeiten der Gruppen SZ und KM betragen nach  $t=72$  h null, da die Hornhäute abgeheilt sind (eine nicht abgeheilte Hornhaut der Gruppe KM zeigte keine weiteren Heilungstendenzen). In der Gruppe KO kommt es aufgrund einer Zunahme der Ulkusfläche der nicht abgeheilten Augen zu negativen Werten nach  $t=60$  h.

In allen Gruppen gab es einen hochsignifikanten Unterschied der Heilungsgeschwindigkeit zwischen den frühen Therapie- ( $t_{1-4}$ ) und späten Beobachtungszeitpunkten ( $t_{4-10}$ ). Nach Beendigung der Behandlung ( $t_4=20$  h) sanken die Heilungsgeschwindigkeiten in allen Gruppen ab (Abb.17).

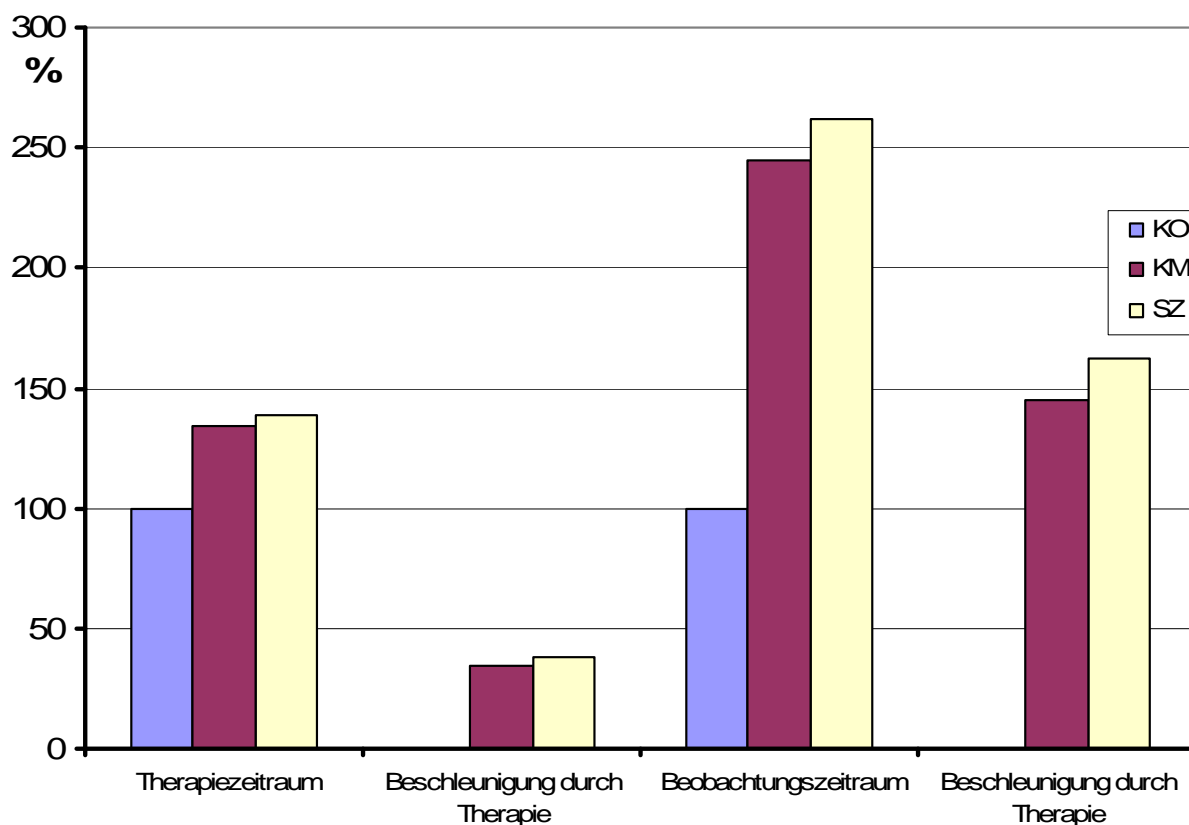
In der KO fiel die Heilungsgeschwindigkeit von 4,08%/h auf 0,29%/h. Dies entspricht einer Reduktion um 92,90%. Die Analyse mit dem Student's t-Test ergab eine

Wahrscheinlichkeit von  $p=2,91 \times 10^{-13}$ , das Ergebnis ist hochsignifikant. In der KM sank die Heilungsgeschwindigkeit von 5,47%/h auf 0,71%/h entsprechend einer Reduktion um 87,03% ( $p=5,59 \times 10^{-19}$ , hochsignifikant). In der SZ erfolgte eine Reduktion der Heilungsgeschwindigkeit um 86,55% von 5,65%/h auf 0,76%/h ( $p=6,14 \times 10^{-13}$ , hochsignifikant). Ein Unterschied zwischen den zellbehandelten Gruppen und der KO bestand weiterhin. Dieser entspricht einem bleibenden Benefit bezüglich der Heilungsgeschwindigkeit von 144,82% (KM) bzw. 162,07% (SZ) gegenüber der KO (Abb.18).



**Abb. 17. Es besteht ein deutlicher Unterschied der mittleren prozentualen Heilungsgeschwindigkeiten zwischen dem Therapie-( $t_{1-4}$ , entspricht 6-20 h) und dem Beobachtungszeitraum( $t_{4-10}$ , entspricht 20-85 h) in allen drei Gruppen.**

Die Balken entsprechen den prozentualen mittleren Heilungsgeschwindigkeiten je Stunde. In beiden Zeiträumen heilen KM bzw. SZ schneller als KO. Die Heilungsgeschwindigkeit fällt in allen drei Gruppen nach beendeter Therapie massiv ab. Die jeweiligen Unterschiede zwischen den Intervallen sind hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ).

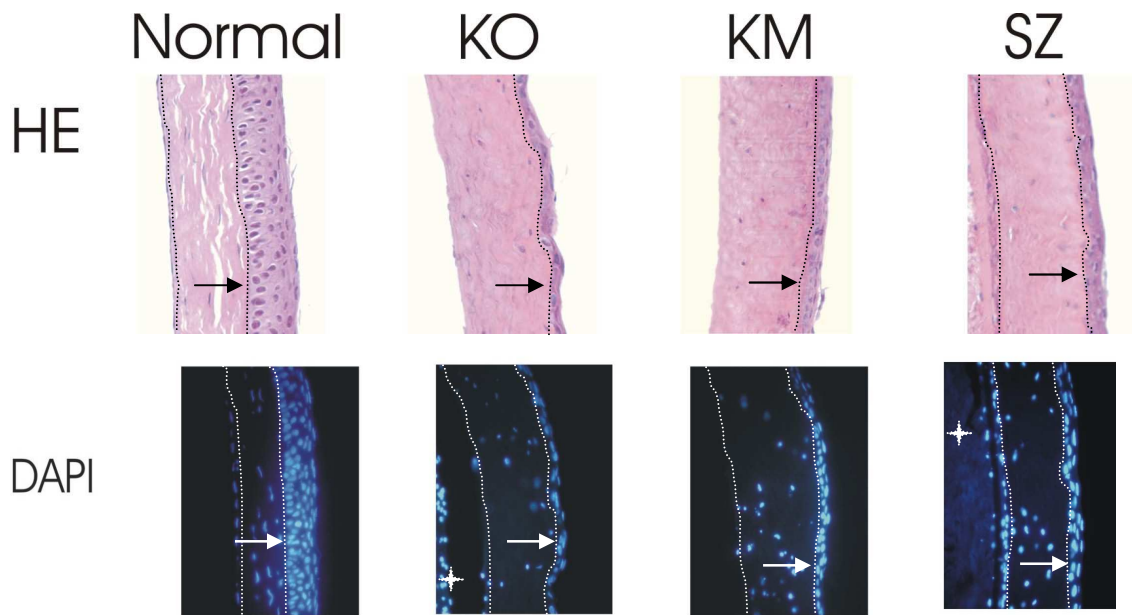


**Abb. 18. In Therapie- und Beobachtungszeitraum ist eine klare Beschleunigung der kornealen Wundheilung der Gruppen SZ und KM gegenüber KO zu beobachten.**

Die relativen Heilungsgeschwindigkeiten gegenüber der KO und der relative Heilungsgewinn sind im Therapie- ( $t_{1-4}$ ) und Beobachtungszeitraum ( $t_{4-10}$ ) dargestellt. Der Wert der KO wurde als 100% angesehen. Die Differenz zwischen den Geschwindigkeiten in den Gruppen SZ und KM gegenüber KO wurde als Benefit im jeweiligen Zeitraum angegeben. Im Beobachtungszeitraum ist ein klarer therapeutischer Gewinn in den Gruppen KM und SZ gegenüber KO zu verzeichnen.

#### **4.4. Zwischen den Hornhautepithelien der behandelten Gruppen besteht morphologisch kein Unterschied.**

Um den Einfluss der applizierten CD117+-HSC bzw. Knochenmarkszellen auf den Aufbau des regenerierten Epithels zu untersuchen, wurden nach dem Beobachtungszeitraum von 85 h Paraffinschnitte nach HE gefärbt. In der normalen Hornhaut besteht das Korneaepithel aus 6-8 Zellschichten (Abb.19). In der HE-Färbung konnte in sämtlichen Gruppen ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel mit 2-3 Zelllagen nachgewiesen werden. Zwischen den Gruppen gab es keine Unterschiede bezüglich der Höhe (in Zelllagen) und Dichte des Epithels.



**Abb. 19. Repräsentative Bilder einer HE-Färbung (oben) und einer DAPI-Kernfärbung (unten) von unbehandelten und behandelten Hornhäuten sind dargestellt.**

Das Epithel der normalen Hornhaut zeigt ein nicht verhorntes 7-schichtiges Epithel. Das Epithel der abgeheilten Augen der drei Gruppen besteht aus 2-3 Zellschichten. Es sind keine Unterschiede im Epithel der Gruppen KO, KM und SZ zu erkennen (Pfeilspitzen zeigen auf das Epithel). Zur besseren Darstellung der Grenzen zwischen Epithel, Stroma und Endothel sind diese mit Linien hervorgehoben. Sterne (↔) markieren mitangeschnittene Linsenanteile. HE 400fach, DAPI 200fach.

#### **4.5. Vybrant™-CFDA SE Zelltracer kann im Hornhautepithel der SZ und KM nachgewiesen werden, eine Zuordnung zu konkreten Zellen ist jedoch nicht möglich.**

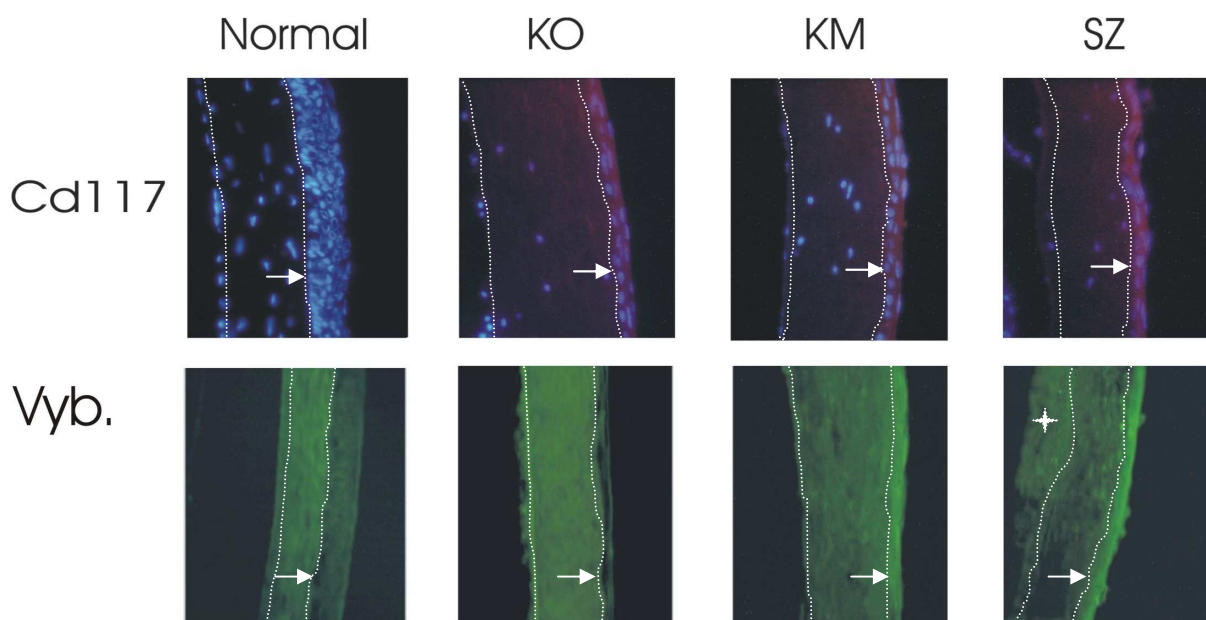
Vybrant™-CFDA SE wird von den Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Esterasen gespalten. Durch die Bindung der fluoreszierenden Spaltprodukte werden Zellproteine angefärbt. Um auf die Hornhautulcera lokal applizierte CD117<sup>+</sup>-HSC und Knochenmarkszellen nachweisen zu können, wurden diese Zellen vorher mit Vybrant™-CFDA SE markiert. Damit konnte die Verteilung bzw. Integration dieser Zellen in die behandelten Hornhäute analysiert werden.

Um den Zelltracer sichtbar zu machen, wurden die Präparate bei einer Wellenlänge von 488 nm mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Abgrenzung der einzelnen Zellen wurde mit dem Farbstoff DAPI eine Kerngegenfärbung durchgeführt. Die Auswertung der markierten Zellen erfolgte qualitativ.

Sowohl in der KM als auch in der SZ konnte der Nachweis des Zelltracers Vybrant™-CFDA SE geführt werden. In beiden Gruppen wies das Epithel eine Fluoreszenz bei



488 nm auf (Abb.20). Die diffuse Anfärbung des Korneaepithels in den Gruppen SZ und KM erlaubte jedoch keine klare Zuordnung zu einzelnen Zellen. Eine Integration der applizierten Zellen konnte damit weder bestätigt noch widerlegt werden.



**Abb. 20. CD117-positive Zellen sind nicht im Epithel der behandelten Augen nachweisbar. Im Epithel der KM und SZ lässt sich die Fluoreszenz des Zelltracers Vybrant™-CFDA SE nachweisen.**

In der Abbildung sind eine Färbung der Hornhäute auf CD117 (oben, mit Kernfärbung DAPI) und die Fluoreszenz des Vybrant™-CFDA SE (Vyb., unten) dargestellt.

Oben: Unbehandelte Hornhäute exprimieren kein CD117. Die Hornhäute der drei Gruppen zeigen eine unspezifische Fluoreszenz des Epithels.

Unten: Unbehandelte und Kontrollhornhäute zeigen keine Fluoreszenz des Epithels. KM und SZ weisen eine diffuse Fluoreszenz des Epithels im Grünbereich (entspricht Vybrant™-CFDA SE) auf. Zur besseren Darstellung der Präparate wurde bei der Aufnahme der unbehandelten Hornhaut und der Kontrolle im Grünbereich überblendet, wodurch das Stroma stark grün erscheint. Teile der Linse sind schnittbedingt mitdargestellt (Stern). Die Linien sollen die Grenzen zwischen Endothel, Stroma und Epithel hervorheben. Fluoreszenzmikroskopie, oben 400fach, unten 200fach.

### 4.6. CD117 wird von heilendem kornealen Epithel nicht exprimiert.

Um lokal integrierte, aber nicht transdifferenzierte CD117+-HSC nachzuweisen, wurden die Präparate immunhistochemisch auf CD117 untersucht.

CD117, auch c-kit, ist eine Bezeichnung für den Stammzellfaktorrezeptor. Ein Nachweis von c-kit gelang an Stammzellen verschiedener Linien sowie an

Mastzellen. Im hämatopoetischen System sinkt die Expression von c-kit mit zunehmender Differenzierung (48). Ein Nachweis von CD117 an Hornhautepithelzellen ist bisher in der aktuellen Literatur nicht beschrieben.

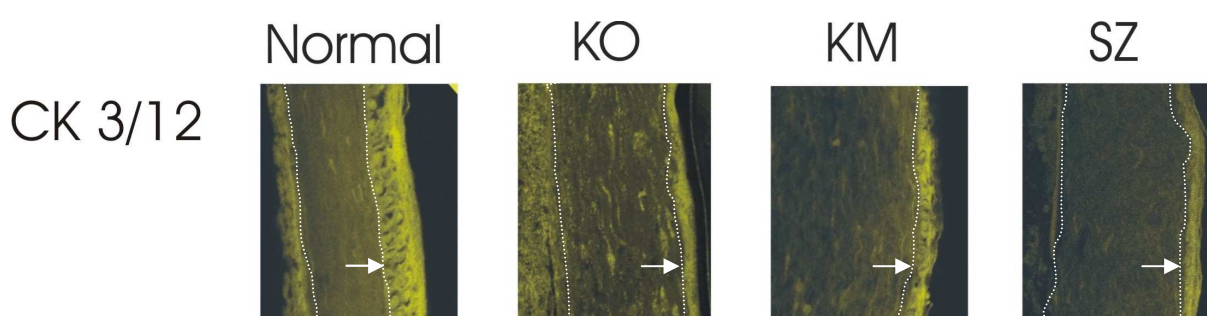
Paraffinschnitte der untersuchten und zweier unbehandelter Augen wurden auf CD117 gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop qualitativ untersucht.

An sämtlichen untersuchten Augen konnte CD117 nicht im kornealen Epithel nachgewiesen werden. Ein Nachweis der applizierten CD117+-HSC und Knochenmarkzellen konnte somit nicht geführt werden.

### 4.7. Cytokeratin 3/12 ist im kornealen Epithel der behandelten Augen nachweisbar.

Die Expression von CK 3/12 ist ein Marker für korneale Epithelzellen (83). Eine Ausnahme sind limbale Stammzellen, welche kein CK 3/12 exprimieren. An Knochenmarkzellen und CD117+-HSC ist CK 3/12 bisher nicht beschrieben. Ein Nachweis von CK 3/12 an den applizierten Zellen würde bedeuten, dass diese Zellen sich in korneale Epithelzellen transdifferenziert haben.

Um die Expression von CK 3/12 im Epithel der behandelten Augen zu analysieren, wurden Paraffinschnitte aller drei Gruppen sowie zweier unbehandelter Kontrollaugen gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem Konfokalmikroskop qualitativ untersucht.



**Abb. 21. Das Epithel unbehandelter und behandelter Hornhäute exprimiert Cytokeratin 3/12.** Fluoreszenzfärbungen auf CK 3/12 von unbehandelten und behandelten Hornhäuten sind abgebildet. Alle Hornhäute zeigen eine Anfärbung des Epithels (Pfeile weisen auf das Epithel). Das Epithel ist für CK 3/12 positiv. Konfokalmikroskopie, 400fach.

In den untersuchten Hornhäuten aller Gruppen waren die anterioren Zellreihen für CK 3/12 positiv. Damit konnten diese Zellreihen dem kornealen Epithel zugeordnet

werden (Abb. 21). Ein Nachweis der applizierten CD117+-HSC und Knochenmarkzellen anhand der fehlenden Expression von CK 3/12 konnte nicht erbracht werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Effekt von CD117+-hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmarkzellen auf die Heilungsgeschwindigkeit und -rate kornealer Epithelverletzungen.

Der positive Effekt einer lokalen Zelltherapie von Hornhautulzera ist im verwendeten Modell hochsignifikant. Die Heilungsrate in der SZ betrug 100% (KO: 66,67%, Benefit: 33,33%) und der mittlere Zeitgewinn betrug 25,98 h, was bei einer durchschnittlichen Heilungsdauer der Kontrollaugen von 55,48 h einer Reduktion um 46,82% entspricht. Die Heilungsrate in der KM betrug 95,67% (Benefit: 29%), der mittlere Zeitgewinn 25,41 h (Benefit: 45,8%). Die Therapien mit Knochenmarkzellen und mit CD117+-HSC sind gleichwertig.

Knochenmark besteht aus verschiedenen Zellen des hämatopoetischen und des myelopoetischen Systemes. Stammzellen sind in geringen Mengen im Knochenmark enthalten (etwa 1 Stammzelle auf 40000 Zellen) (48). Zwischen den verschiedenen Zellen des Knochenmarkes bestehen äußerst komplexe Wechselwirkungen über direkte und indirekte (auto-, parakrine und humorale) Zellkontakte (31, 58).

Insgesamt wurde je Hornhaut in der KM 75000 Knochenmarkzellen aufgebracht. Dies entspricht 1,8 Stammzellen pro Hornhaut. Dagegen betrug in der SZ die Zahl der CD117+-HSC 75000 pro Hornhaut.

Ein signifikanter therapeutischer Unterschied zwischen der lokalen Applikation von CD117+-HSC und Knochenmark auf die Heilungsrate und -geschwindigkeit der Ulcera besteht nicht. Gegenüber den Kontrollen haben beide Zelltherapien einen positiven Einfluss auf die Heilung der Hornhautulcera.

Daraus ergeben sich mehrere Schlussfolgerungen:

- a) Lokal applizierte Knochenmarkzellen und CD117+-HSC haben einen positiven Effekt auf die korneale Wundheilung.
- b) Da der therapeutische Effekt von CD117+-HSC und Knochenmarkzellen gleichwertig ist, scheint die Art der applizierten Zellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.
- c) Die im Stammzellmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren scheinen einen positiven Effekt auf die korneale Wundheilung auszuüben. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der Tatsache, dass in der KO eine

Abflachung der Heilungsgeschwindigkeit nach Ende des Therapiezeitraumes (Kontrollbehandlung mit Stammzellmedium mit Wachstumsfaktoren) zu beobachten war. In der aktuellen Literatur werden die verwendeten Wachstumsfaktoren (SCF, TPO und G-CSF) bei der kornealen epithelialen Wundheilung nicht beschrieben.

- d) Die Förderung der Wundheilung durch CD117+-HSC und Knochenmarkzellen ist zusätzlich zu dem Effekt der Wachstumsfaktoren zu beobachten.

Werden während dem Beobachtungszeitraum keine weiteren Zellen aufgetragen, reduziert sich die Heilungsgeschwindigkeit in allen drei Gruppen. Ein positiver Effekt in der KM und der SZ scheint jedoch im Verlauf des Beobachtungszeitraumes zu persistieren. D.h. der Einfluß der aufgetragenen Zellen ist nicht nur während des Therapiezeitraumes nachweisbar. Dies legt die Vermutung nah, dass durch die Zelltherapie anhaltende Heilungsprozesse aktiviert wurden.

Eine Integration der applizierten CD117+-HSC und Knochenmarkzellen in den Epithelverband konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine Fluoreszenz des Epithels in der KM und SZ, nicht dagegen in der KO im Emissionsbereich des Vybrant™-CFDA SE. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass der mit den hämatopoetischen Zellen applizierte Zelltracer auf das Epithel übertragen wurde.

### 5.2. Mögliche Erklärungen

Die korneale Wundheilung ist ein äußerst komplexer Vorgang. Trotz intensiver Forschungen sind die Heilungsprozesse der Kornea bisher erst teilweise entschlüsselt. Während die morphologischen Vorgänge bereits relativ eingehend beschrieben wurden, sind viele molekularbiologische Abläufe noch ungeklärt. Erschwerend kommt hinzu, dass die korneale Wundheilung nicht als uniformer Prozess verstanden werden kann, da die jeweilige Ursache und das Ausmaß der Schädigung eine dementsprechende individuelle Körperantwort hervorrufen. Insbesondere die Faktoren der extrazellulären Matrix, die Cytokine als humorale Faktoren des Tränenfilms und auto- und parakrine Stimuli variieren bei den verschiedenartigen Formen der kornealen Wundheilung. Daher kommen mehrere Hypothesen in Frage.

### **Humorale Hypothese**

Ein Grossteil der Kommunikation zwischen Zellen erfolgt über humorale Faktoren (u.a. Cytokine, Chemokine, Interleukine, im weiteren Text zusammengefaßt als Cytokine). Je nach Stimulus werden von den Zellen verschiedene dieser Faktoren freigesetzt, die dann die Zellen selbst (autokrin) oder andere Zellen (parakrin) beeinflussen. Inflammations- und Wundheilungskaskaden bestehen aus einer Vielzahl dieser Cytokine. An der Kornea ist eine Vielzahl dieser Faktoren bekannt, welche die korneale Homoeostase und Wundheilung beeinflussen (95, 96, 97). Insbesondere IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  wird dabei eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Werden diese Faktoren zugeführt, kommt es zu einer Veränderung der kornealen Heilungsgeschwindigkeit. Daraus ergibt sich folgende Erklärungsmöglichkeit bezüglich der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse:

Die applizierten Zellen sezernieren verschiedene Cytokine, und diese führen in der Summe zu einer Beschleunigung der kornealen Reepithelialisierung. Knochenmark- und Stammzellen kommunizieren in ihrem natürlichen Milieu mittels multipler Cytokine mit benachbarten Zellen und nehmen so über komplexe Regelkreise parakrin Einfluß auf Proliferation, Differentiation und Migrationsverhalten dieser Zellen. Außerdem beeinflussen Knochenmark- und Stammzellen sich selbst über autokrine Mechanismen (58).

Die Proliferation und Migration des kornealen Epithels resultiert daher aus der Summe der mit dem Medium aufgebrachten Cytokine und weiteren von Knochenmarkzellen und CD117+-HSC sezernierten Faktoren.

Dafür spricht, dass weder Knochenmarkzellen noch CD117+-HSC schlüssig im untersuchten Epithel nachgewiesen werden konnten und die Heilungsraten zwischen KM und SZ gleich waren, sowie die Reduzierung der Heilungsgeschwindigkeit im Beobachtungszeitraum. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die applizierten hämatopoetischen Zellen bei den Waschvorgängen während der photographischen Dokumentation entfernt wurden und damit nach Beendigung der Therapie keine weiteren Faktoren zugeführt wurden.

Knochenmark und Stammzellen sind verschieden. Die verwendeten CD117+-HSC stellen letztendlich ein Extrakt des Knochenmarks dar. Knochenmark besteht aus einer Mischung aus Zellen verschiedenster Stufen der Hämatopoese, Thrombopoese

und Myelopoese (27, 42). Im Knochenmark sind in geringen Mengen Stammzellen enthalten. Aufgrund der hochgradigen Zellmischung im Knochenmark ist jedoch ein Cocktail an sezernierten Cytokinen zu erwarten mit sowohl wachstumsfördernden als auch proliferationshemmenden Eigenschaften (3, 31, 35, 42). Die verwendeten CD117<sup>+</sup>-HSC hingegen stellen eine relativ homogene Zellpopulation dar (mit der Einschränkung, dass CD117 von Stammzellen in sehr frühen Differenzierungsstadien exprimiert wird), die in diesem Stadium nur einen Teil dieser Cytokine selbst produzieren kann.

Da jedoch auch im Beobachtungszeitraum ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen gegenüber der Kontrolle bestand, stellt sich die Frage, woraus dieser persistierende Effekt resultiert. Eine mögliche Erklärung wäre eine Aktivierung von Heilungsvorgängen während des Therapiezeitraumes, die erst nach längerer Zeit nachlassen.

### ***Transdifferenzierungshypothese***

Zhao et al. konnten *in vitro* Stammzellen aus dem Blut gewinnen und diese in verschiedene Zelllinien, darunter auch epitheliale Zellen transdifferenzieren (102). Auch andere Untersuchungen konnten *in vivo* eine Integration oder auch Transdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in verschiedenen Geweben, unter anderem auch der Kornea, nachweisen (14, 29, 56, 80). Allerdings wurden diese Untersuchungen an bestrahlten Tieren bzw. bei systemischen Knochenmarks-/Stammzelltransplantationen durchgeführt. Es wäre möglich, dass die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auf einer Transdifferenzierung und Integration der applizierten Zellen in den Gewebeverband beruhen. Dies würde die diffuse Fluoreszenz des Epithels in den KM und SZ erklären. Allerdings ist diese Erklärung nur zum Teil schlüssig.

Zwar konnte Zhao et al. *in vitro* eine Umwandlung von Stammzellen bei Stimulation von bis zu 70% nachweisen (102). *In vivo* ist die Transdifferenzierung jedoch weitaus seltener (0,01%-16%) (90).

Die Wahrscheinlichkeit einer Transdifferenzierung liegt demzufolge bei 1 bis 160 transdifferenzierten Zellen auf 10000 Stammzellen, was eine größere Beeinflussung der Wundheilung in diesem Experiment als unwahrscheinlich erscheinen lässt (2,5 bis 400 mögliche Ereignisse je Therapiezeitpunkt). Eine zumindest teilweise Transdifferenzierung der applizierten CD117<sup>+</sup>-HSC ist allerdings nicht

auszuschließen und könnte die Positivität des Epithels für den Zelltracer erklären. Allerdings müsste in einem solchen Fall aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der Stammzellen eine erhebliche Differenz im zeitlichen Heilungsverlauf zwischen der SZ und der KM auftreten. Die Hornhautulcera in der SZ und KM heilten jedoch gleich schnell ab.

### **Zellfusionshypothese**

Zellfusionsphänomene bei Stammzellen konnten von mehreren Autoren in verschiedenen Geweben beobachtet werden (2, 87, 100). Die Verschmelzung von Stammzellen mit Zellen lokaler Gewebe erfolgte unabhängig von eventuellen Transdifferenzierungsvorgängen. Es wäre möglich, dass die applizierten CD117+-HSC mit Epithelzellen der Korneae verschmolzen sind und die entstehenden Zellen veränderte Eigenschaften aufweisen, welche letztendlich zu einer gesteigerten Wundheilung führen. Die beschleunigte Wundheilung in der SZ könnte somit Folge der Zellfusion sein. Allerdings kann damit nicht erklärt werden, weshalb die korneale Wundheilung in der KM dem in der SZ gleichwertig ist, da für einen Großteil der Knochenmarkszellen eine Zellfusion nicht in Frage kommt (Erythrozyten, Thrombozyten u.a.). Auch wenn Zellfusionsphänomene nicht ausgeschlossen werden können, ist doch anzunehmen, dass Zellfusionsereignisse zwischen Hornhautepithel- und Stammzellen nur eine marginale Rolle bei der Abheilung der Hornhautulcera spielen.

### **Zell-Zell-Hypothese**

Direkte Zell-Zell-Kontakte sind in vielen Prozessen der Wundheilung bekannt. Zelluläre Adhärenz und Migration erfolgen zu einem großen Teil mit Hilfe dieser Kontakte. Es ist z. B. bekannt, dass über spezielle Rezeptoren (ICAM – intercellularly adhesion molecule) im Blut zirkulierende Zellen an die Gefäßwand anheften, bevor sie in die Gewebe einwandern (64). Sowohl die sich anheftenden Zellen als auch Endothelzellen der Gefäßwand werden dabei beeinflusst, was in der Summe die Migration der zirkulierenden Knochenmark- oder Stammzellen durch die Gefäßwand hinweg ins Gewebe ermöglicht. Ähnliche Mechanismen wären an der Hornhaut vorstellbar, zumal Adhäsionsmoleküle wie ICAM am kornealen Epithel nachgewiesen wurden (66). Durch einen solchen Mechanismus könnten die Epithelzellen aktiviert werden und in der Folge die Wundheilung beschleunigen. Würden keine weiteren



Zellen appliziert, käme es zu einer Reduktion der Aktivität der stimulierten Epithelzellen und damit der Wundheilungsgeschwindigkeit. Dies könnte die Reduktion der Heilungsgeschwindigkeit in der KM und SZ während des Beobachtungszeitraumes erklären. Allerdings wäre die Frage nicht geklärt, woher die Fluoreszenz des Epithels in der KM und SZ, nicht aber KO resultiert.

### ***Matrix-Hypothese***

Der Einfluss der Extrazellulärmatrix (ECM) auf die Wundheilung wurde in den letzten Jahren zunehmend erforscht. Verschiedene Proteine der ECM spielen bei sämtlichen Wundheilungsvorgängen im Körper eine große Rolle. Im Blut ist dies während der Thrombenbildung bei der alternativen Aktivierung der Gerinnungskaskade eingehend beschrieben. In der Kornea wurden ähnliche Mechanismen unter anderem von Cao et al., Fujiwara et al. und Suzuki et al. nachgewiesen (9, 10, 20, 84). Bisher konnte der positive Einfluss von Fibronectin, Galectin und verschiedenen Kollagenen auf die korneale Wundheilung identifiziert werden.

Die Applikation von Knochenmarkzellen und CD117+-HSC könnte zu einer aktiven Sekretion von Matrixproteinen durch die applizierten Zellen selbst, Epithel und/oder Stromakeratozyten führen, die dann in der Summe die Wundheilung beschleunigen. Außerdem könnten Bestandteile der aufgetragenen Zellen oder die Zellen selbst am Ulkusgrund adhärieren und damit eine Wachstumsfläche für die Epithelien schaffen. Dies würde prinzipiell einer Schicht von „feeder cells“, welche bei der Zellzucht verwendet werden, entsprechen. Die Fluoreszenz des Epithels wäre dann Ausdruck der Prozessierung dieser Proteine/Zellbestandteile durch die eingewanderten Epithelzellen.

### **5.3. Ausblick**

In den durchgeführten Untersuchungen konnte erstmalig ein klarer positiver Effekt lokal applizierter Knochenmarks- und CD117+-HSC auf die korneale Wundheilung festgestellt werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen können zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund des aktuellen Forschungsstandes nicht abschließend geklärt werden. Mit Hilfe von molekulargenetischen Untersuchungen (Genomics und Proteomics) könnte dieser Sachverhalt in Zukunft geklärt werden.

Da es sich um einen *in vitro* Versuch handelt, müssen die Ergebnisse *in vivo* überprüft werden, bevor sich endgültige Aussagen zur klinischen Anwendbarkeit treffen lassen. Die komplexen Interaktionen an der geschädigten Hornhaut können in der Organkultur nur teilweise nachgestellt werden. Insbesondere neurohumorale Reaktionen über den trigeminofaszialen Reflexbogen sind *in vitro* ausgeschaltet. Die mechanische Irritation und Abschilferung des Epithels durch Lidschlag und Augenbewegung ist in Kultur eliminiert. Das Kulturmedium kann die komplexen Vorgänge im Körper nicht ersetzen. Die inkompletten Kenntnisse des lokalen Stoffwechsels und der zellulären Interaktionen erlauben es nicht, ein absolutes Modell entsprechend den *in vivo* Bedingungen zu kreieren, so dass die erhaltenen Ergebnisse in dieser Hinsicht nur eingeschränkt verwertbar sind.

Da die verwendeten Wachstumsfaktoren einen positiven Einfluss auf die Heilungsgeschwindigkeit der Hornhautläsionen zeigten, könnte sich ein weiterer Ansatzpunkt zur Therapie von Hornhautulcera mit Hilfe dieser Faktoren ergeben.

Die gewonnenen Erkenntnisse könnten zur Entwicklung neuer Therapiemethoden bei kornealen Problemwunden beitragen. Zukünftige Untersuchungen sollten die Wirkungsweise der verwendeten Wachstumsfaktoren und der applizierten Zellen auf das korneale Epithel klären.

### 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von lokal applizierten Knochenmarkzellen und CD117+-HSC auf den zeitlichen Verlauf der kornealen Wundheilung zu überprüfen. Dazu wurde ein murines *in vivo/in vitro*-Modell etabliert. CD117+-HSC wurden mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS) aus dem murinen Knochenmark separiert. Standardisierte Hornhautläsionen von 2 mm Durchmesser wurden mit NaOH-getränktem Papier gesetzt. 6 h nach der Läsion wurden die verletzten Augen in Organkultur gebracht. Zu drei Zeitpunkten (6, 12 und 16 h) wurden je 25 µl mit dem Zelltracer Vybrant™-CFDA SE-markierte Knochenmarkzellen bzw. CD117+-HSC (1000 Zellen/µl), als Kontrolle 25 µl Stammzellmedium appliziert. Ab dem vierten Untersuchungszeitpunkt (20 h) wurden alle drei Gruppen mit Hornhautmedium behandelt.

Der Wundheilungsprozess wurde über einen Zeitraum von insgesamt 85 h beobachtet. An 10 Zeitpunkten wurden die Läsionen dokumentiert und ein kompletter Austausch des Kulturmediums durchgeführt. Nach 85 h wurden die Gewebe histologisch auf Vybrant™-CFDA SE, CD117 und CK 3/12 untersucht.

Die erzielten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) Die Heilungsrate alkalischer Hornhautverätzungen wird im verwendeten Modell durch lokal applizierte Knochenmarkzellen und CD117+-HSC signifikant erhöht.
- 2) Lokal applizierte Knochenmarkzellen und CD117+-HSC beschleunigen die korneale Wundheilung signifikant.
- 3) Der Heilungsprozess verläuft im verwendeten Modell biphasisch. Im Therapiezeitraum (6, 12 und 16 h) ist die mittlere Heilungsgeschwindigkeit in allen drei Gruppen signifikant höher als im Beobachtungszeitraum (20, 24, 36, 48, 60, 72 und 85 h).
- 4) Auch nach beendeter Therapie mit lokal applizierten Knochenmarkzellen und CD117+-HSC ist die Wundheilungsgeschwindigkeit der zellbehandelten Augen signifikant höher als bei den Kontrollaugen.
- 5) Ein statistischer Unterschied zwischen den Effekten von Knochenmarkzellen und CD117+-HSC auf die korneale Wundheilung besteht nicht.
- 6) Die Wachstumsfaktoren des Stammzellmediums scheinen einen positiven Einfluss auf die korneale Wundheilung auszuüben. Die Therapie kornealer

Ulcera mit lokal applizierten Knochenmarkzellen und CD117+-HSC ist gegenüber einer Behandlung nur mit den Wachstumsfaktoren signifikant überlegen.

- 7) Vybrant™-CFDA SE konnte im Epithel der KM und SZ nachgewiesen werden. Der Zelltracer konnte jedoch keiner Zelllinie konkret zugeordnet werden. Eine Integration der applizierten hämatopoetischen Zellen konnte daher in beiden Gruppen weder bestätigt noch negiert werden. CD117 war im heilenden kornealen Epithel nicht nachweisbar. CK 3/12 wird vom kornealen Epithel der KO, KM und SZ exprimiert.

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl Knochenmarkzellen als auch CD117+-HSC lokal einen statistisch signifikant positiven Effekt auf die korneale Wundheilung ausüben. Beide Therapieansätze könnten interessante Ergänzungen zu den aktuellen Behandlungsstrategien von kornealen Problemwunden darstellen.

Vor einer klinischen Anwendung sollten jedoch weitere Untersuchungen *in vivo* erfolgen, um eventuell auftretende Komplikationen bei solchen Therapien erkennen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) Abedi M, Greer DA, Colvin GA, Demers DA, Dooner MS, Harpel JA, Pimentel J, Menon MK, Quesenberry PJ: Tissue injury in marrow transdifferentiation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32 (2004) 42-46
- 2) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Buylla AA: Fusion of bone marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425 (2003) 968-973
- 3) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Tajubo K, Ito K, Koh GY, Suda T: Tie2/angiopoietin-1 signalling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118 (2004) 149-161
- 4) Arai F, Hirao A, Suda T: Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *Int. J. Hematol.* 82 (2005) 371-376
- 5) Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U: Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (2004) 4251-4255
- 6) Baron MH: Reversibility of the differentiated state in somatic cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5 (1993) 1050-1056
- 7) Brewitt H: Sliding of epithelium in experimental corneal wounds. A scanning electron microscopic study. *Acta Ophthalmol. (Copenh).* 57 (1979) 945-958
- 8) Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DM, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT: Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425 (2003) 841-846
- 9) Cao Z, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M, Hsu DK, Kuwabara I, Liu FT, Panjwani N: Galectins-3 and -7, but not Galectin-1, play a role in re-epithelialisation of wounds: *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42299-42305
- 10) Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu FT, Panjwani N: Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration: *Arch. Ophthalmol.* 121 (2003) 82-86
- 11) Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G: Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 21 (2003) 131-142

- 12) Cho H, Ide C, Tazawa Y: Nerve regeneration in cornea after penetrating keratoplasty in rabbit, with special reference to relationship between regenerating nerves and basal laminae. *Jpn. J. Ophthalmol.* 32 (1988) 255-263
- 13) Dogru M, Tsubota K: Current concepts in ocular surface reconstruction. *Semin. Ophthalmol.* 20 (2005) 75-93.
- 14) Dooner M, Cerny J, Colvin G, Demers D, Pimentel J, Greer D, Abedi M, McAuliffe C, Quesenberry P: Homing and conversion of murine hematopoietic stem cells to lung. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32 (2004) 47-51
- 15) Ferraris C, Chevalier G, Favier B, Jahoda CA, Dhouailly D: Adult corneal epithelium basal cells possess the capacity to activate epidermal, pilosebaceous and sweat gland genetic programs in response to embryonic dermal stimuli. *Development* 127 (2000) 5487-5495
- 16) Feuchtinger TF: Isolation von humanen CD4+ dendritischen Zellen aus zirkulierendem Blut und ihr Verhalten bei Stimulation. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum 2000
- 17) Filip S, Mokr J., Hručka I: Adult Stem Cells and Their Importance in Cell Therapy. *Folia Biologica* 49 (2003) 9-14
- 18) Forbes J, Collin R, Dart J: Split thickness buccal mucous membrane grafts and beta irradiation in the treatment of recurrent pterygium. *Br. J. Ophthalmol.* 82 (1998) 1420-1423
- 19) Fountain TR, de la Cruz Z, Green WR, Stark WJ, Azar DT: Reassembly of corneal epithelial adhesion structures after excimer laser keratectomy in humans. *Arch. Ophthalmol.* 112 (1994) 967-972
- 20) Fujikawa LS, Foster CS, Gipson IK, Colvin RB: Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies. *J. Cell Biol.* 98 (1984) 128-138
- 21) Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB: Fibronectin in healing rabbit wounds. *Lab. Invest.* 45 (1981) 120-129
- 22) Gabri NC, Mravi I, Ci C, Dekaris I, Karaman Ž, Mitrovi S: Human amniotic membrane in the reconstruction of the ocular surface. *Documenta Ophthalmologica* 98 (2000) 273–283
- 23) Gipson IK, Friend J, Spurr SJ: Transplant of corneal epithelium to rabbit corneal wounds in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26 (1985) 425-433

- 24) Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Ellwell J, Stepp MA: Redistribution of the hemidesmosome components  $\alpha 6\beta 4$  integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp. Cell Res.* 207 (1993) 86-98
- 25) Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Keough M: Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30 (1989) 425-434
- 26) Goodell MA: CD34+ or CD34-: Does it Really Matter? *Blood.* 94 (1999) 2544-2547
- 27) Grandel D: Isolierung und Charakterisierung der hämatopoietischen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut beim Rind (*Bos taurus*). Dissertation. München 2005
- 28) Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G: Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 440 (2006) 1199-1203
- 29) Haas S, Weidner N, Winkler J: Adult stem cell therapy in stroke. *Curr. Opin. Neurol.* 18 (2005) 59-64.
- 30) Hagemann P, Kia T, Ludwig R: Immunsystem und zelluläre Identität. In: Abdolvahab-Emminger, H. (Hrsg.): *Physikum Exakt.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1997, S. 905
- 31) Han W, Yu Y, Liu XY: Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell Res.* 16 (2006) 189-195
- 32) Hass R: Retrodifferentiation and cell death. *Crit. Rev. Oncog.* 5 (1994) 359-371
- 33) Heissig B, Ohki Y, Sato Y, Rafii S, Werb Z, Hattori K: A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology.* 10 (2005) 247-253.
- 34) Hennessy B, Körbling M, Estrov Z: Circulating stem cells and tissue repair. *Panminerva Med.* 46 (2004) 1-11
- 35) Hiro A, Arai F, Suda T: Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle.* 3 (2004) 1481-1483
- 36) Hofling AA, Vogler C, Creer MH, Sands MS: Engraftment of human CD34-cells leads to widespread distribution of donor-derived cells and correction of tissue pathology in a novel murine xenotransplantation model of lysosomal storage disease. *Blood.* 101 (2003) 2054-2063

- 37) Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S: Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog. Ret. Eye Res.* 19 (2000) 113-129
- 38) Ishizaki M, Shimoda M, Wakamatsu K, Ogro T, Yamanaka N, Kao CW, Kao WW: Stromal fibroblasts are associated with collagen IV in scar tissues of alkali-burned and lacerated corneas. *Curr. Eye Res.* 16 (1997) 339-348
- 39) Junqueira LC, Carneiro J: Das Auge. In Schiebler TH, Schneider F (Hrsg): *Histologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg 1991, S. 659-661
- 40) Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y, Shimoda K, Minoguchi M, Akira S, Tanaka M, Miyajima , Kitamura T, Nakauchi H: Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 202 (2005) 169-179
- 41) Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H: Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth. *Exp. Cell Res.* 295 (2004) 194-203
- 42) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE: Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circ. Res.* 94 (2004) 678-685
- 43) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S: Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 108 (2001) 1569-1574
- 44) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 105 (2001) 369-377
- 45) Kruse FE, Reinhard T: Die Limbustransplantation zur Rekonstruktion der Augenoberfläche. *Ophthalmologie* 98 (2001) 818–831
- 46) Kucia M, Ratajczak J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ: Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32 (2004) 52-57
- 47) Lang GK: Hornhaut (Kornea). In: Lang GK. *Augenheilkunde*. Thieme-Verlag Stuttgart New York 1998; S.119-122



- 48) Lyman SD, Jacobsen SE: c-kit ligand and FLT3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 91 (1998) 1101-1134
- 49) Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L: Reconstruction of Chemically Burned Rat Corneal Surface by Bone Marrow–Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 24 (2006) 315-321
- 50) Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ: Stem cell biology - a never ending quest for understanding. *Acta Biochimica Polonica* 52 (2005) 353-358
- 51) Matic M, Petrov IN, Rosenfeld T, Wolosin JM: Alterations in connexin expression and cell communication in healing corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (1997) 600-609
- 52) Miltenyi Biotec: MACS Magnetic Cell Sorting with Indirect MicroBeads. Order No. 130-048-602, [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com): 1-3
- 53) Moore KA: Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche. *Curr. Opin. Hematol.* 11 (2004) 107-111
- 54) Muraine M, Descargues G, Franck O, Villeroy F, Toubeau D, Menguy E, Martin J, Brasseur G: Amniotic membrane graft in ocular surface disease. Prospective study with 31 cases. *J. Fr. Ophtalmol.* 24 (2001) 798-812
- 55) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S: Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br. J. Ophthalmol.* 88 (2004) 1280-1284
- 56) Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, Hisatomi T, Qiao H, Yamada J, Fukata M, Ishibashi T, Harada M, Kinoshita S: Characterization and Distribution of Bone Marrow–Derived Cells in Mouse Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (2005) 497–503
- 57) Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S: Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea*. 22 (2003) 70-71
- 58) Nilsson SK, Simmons PJ: Transplantable stem cells: home to specific niches. *Curr. Opin. Hematol.* 11 (2004) 102–106
- 59) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y: Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium. *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1187-1196

- 60) Nuijts RMMA: Autologous limbal transplantation in unilateral chemical burns. *Documenta Ophthalmologica* 98 (2000) 257-266
- 61) Okuno Y, Iwasaki H, Huettner CS, Radomska HS, Gonzalez DA, Tenen DG, Akashi K: Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *PNAS* 99 (2002) 6246–6251
- 62) Oostendorp RA, Robin C, Steinhoff C, Marz S, Brauer R, Nuber UA, Dzierzak EA, Peschel C: Long-term maintenance of hematopoietic stem cells does not require contact with embryo-derived stromal cells in cocultures. *Stem Cells*. 23 (2005) 842-851
- 63) Pearton DJ, Ferraris C, Dhouailly D: Transdifferentiation of corneal epithelium: evidence for a linkage between the segregation of epidermal stem cells and the induction of hair follicles during embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004) 197-201
- 64) Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T: The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 95 (2000) 3289-3296
- 65) Pfister RR: The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: a scanning electron microscope study. *Invest. Ophthalmol.* 14 (1975) 648-661
- 66) Philipp W, Göttinger W: Leucocyte adhesion molecules in diseased corneas. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 99 (1993) 1400-1407
- 67) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P: Chimerism of the transplanted heart: *N. Engl. J. Med.* 346 (2005) 5-15
- 68) Ratkay-Traub I, Hopp B, Bor Z, Dux L, Becker DL, Krenacs T: Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junctions, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. *Exp. Eye Res.* 73 (2001) 291-302
- 69) Reim M, Redbrake C, Schrage N: Heridas oculares químicas y térmicas. Tratamiento quirúrgico y medico basado en hallazgos clínicos y patofisiológicos. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 76 (2001) 79-124

- 70) Riede UN, Herbst EW: Immunpathologie. In: Riede U-N, Schaefer H-E (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Aufl. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1999:170-198
- 71) Riede UN, Schaefer HE: Nekrose. In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Aufl. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1999:137-140
- 72) Sato T, Laver JH, Ogawa M: Reversible Expression of CD34 by Murine Hematopoietic Stem Cells. *Blood*. 94 (1999) 2548-2554
- 73) Schöpp S: Molekularbiologische Identifizierung und immunophänotypische Charakterisierung der malignen Zellen beim Sézary Syndrom unter Berücksichtigung von Klinik und Prognose. Dissertation. Berlin, 2004
- 74) Schwab IR: Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 97 (1999) 891-986
- 75) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, and Verfaillie CM: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1291-1302
- 76) Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K: Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 109 (2002) 1285-1290
- 77) Simmer M: Flow Cytometry: A Technology to Count and Sort Cells. Internetpublikation: <http://bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/FlowCytometry/>
- 78) Song E, Yang W, Cui ZH, Dong Y, Sui DM, Guan XK, Ma YL: Transplantation of human limbal cells cultivated on amniotic membrane for reconstruction of rat corneal epithelium after alkaline burn. *Chin. Med. J. (Engl)*. 118 (2005) 927-935
- 79) Song IK, Joo CK: Morphological and functional changes in the rat cornea with an ethanol-mediated epithelial flap. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (2004) 423-428
- 80) Sosnova M, Bradl M, Forrester JV: CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stemcell markers. *Stem Cells*. 23 (2005) 507-515
- 81) Sotozono C, He JC, Matsumoto Y, Kita M, Imanishi J, Kinoshita S: Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr. Eye Res.* 16 (1997) 670-676

- 82) Stepp MA, Zieske JD: The corneal epithelial stem cell niche. *The Ocular Surface* 3 (2005) 15-26
- 83) Sun TT, Lavkerw RM: Corneal Epithelial Stem Cells: Past, Present, and Future. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 9 (2004) 202-207
- 84) Suzuki K, Saito J, Yanai R, Yamada N, Chikama T-I, Seki K, Nishida T: Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog. Ret. Eye Res.* 22 (2003) 113-133
- 85) Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T: Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000) 2495-2500
- 86) Tajima F, Sato T, Laver JH, Ogawa M: CD34 expression by murine hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 96 (2000) 1989-1993
- 87) Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 (2002) 542-545
- 88) Vallier L, Alexander M, Pedersen RA: Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4495-4509
- 89) Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R: Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood* 92 (1998) 3189-3202
- 90) Verfaillie CM: Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 12 (2002) 502-508
- 91) Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, Miyazawa N, Iwanaga T, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A: Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford).* 42 (2003) 162-165
- 92) Weiler SR, Gooya JM, Ortiz M, Tsai S, Collins SJ, Keller JR: D3: a gene induced during myeloid differentiation of Linlo c-Kit+ Sca-1(+) progenitor cells. *Blood.* 93 (1999) 527-536
- 93) Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP: Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the World Health Organization,* 79 (2001) 214–221

- 94) Wilson SE: Molecular cell biology for the refractive corneal surgeon: programmed cell death and wound healing. *J. Refract. Surg.* 13 (1997) 171-175
- 95) Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL: Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp. Eye Res.* 62 (1996) 325-327
- 96) Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR: Stromal-Epithelial Interactions in the Cornea. *Prog. Ret. Eye Res.* 18 (1999) 293-309
- 97) Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrosio R Jr, Hong JW, Lee JS: The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog. Ret. Eye Res.* 20 (2001) 625-637
- 98) Wollert KC, Drexler H: Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ. Res.* 96 (2005) 151-163
- 99) Yamada M, Mashima Y: Changes in proliferation and differentiation of basal cells during wound healing of rabbit corneal epithelial abrasions. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 99 (1995) 10-16
- 100) Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG: Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416 (2002) 545-548
- 101) Zhang CC, Lodish HF: Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion. *Blood First Edition Paper*, prepublished online February 8, 2005; DOI 10.1182/blood-2004-11-4418
- 102) Zhao Y, Glesne D, Huberman E: A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Cell Biology* 100 (2003) 2426-2431
- 103) Ziegler A, Lange S, Bender S: Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 127 (2002) 14-16
- 104) Zieske JD, Bukusoglu G, Gipson IK: Enhancement of vinculin synthesis by migrating stratified squamous epithelium. *J. Cell Biol.* 109 (1989) 571-576

## 8. Anlagen

### Materialverzeichnis

#### *Utensilien*

Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml	Fa. TPP, Schweiz
12-Loch Zellkulturplatten	Fa. TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen 50 ml (25 cm <sup>2</sup> )	Fa. Becton Dickinson
Einwegspritzen 1 ml (Einteilung 10 µl)	Fa. Becton Dickinson
Sterican- Kanülen 27 G x 3/4"	Fa. Braun
Filterpapier hardened circles 70 mm	Whatman Inc.
2.0 mm Harris Micro Punch and Mat	Whatman Inc.
Sterile Falcon-24-Well-Schalen für Zellkultur	Fa. Becton Dickinson
Färbekammer	Fa. Shandon Coverplate

#### *Chemikalien*

NaOH	Fa. Merck
Vybrant™ CFDA SE Cell tracer kit	Fa. Molecular Probes
Trypanblau Lösung 0,4%	Fa. Sigma
PBS (phosphat buffered saline)	Fa. Sigma
Ethanol	Fa. Riedel-de Haen
Xylol	Fa. Fluka
Hämalaun	Fa. Merck
Eosin	Fa. Merck
DAPI (4'6'-Diamidin-2'-phenylindol- dihydrochlorid)	Fa. Sigma
Tween 20	Fa. Roth
7-AAD (7-Aminoactinomycin D)	Fa. Sigma
Einbett-Paraffin	Polysciences Inc.

#### *Antikörper:*

Primärantikörper:

---

MACS CD117 Microbeads mouse	Fa. Miltenyi Biotech
C-Kit-Antikörper Rabbit polyclonal anti-CD117(ab5506)	Fa. Abcam
Mab to Cytokeratin 3/12 mouse monoclonal	Fa. Progen Biotechnik

## Sekundärantikörper:

Alexa Fluor 555 goat anti mouse IgG (H+L)	Fa. Molecular Probes
Alexa Fluor 633 F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)	Fa. Molecular Probes

**Medien**

Stemline II-Stammzellmedium	Fa. Sigma
Thrombopoietin (TPO), mouse recombinant	Fa. Sigma
Stem cell factor (SCF), mouse recombinant	Fa. Sigma
G-CSF (Filgrastim, Neupogen)	Fa. Amgen
Strepto-fatol	Fa. Fatol Arzneimittel
Penicillin G	Fa. Jenapharm
N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin 200mM	Fa. Biochrom KG

## Stammzellmedium:

Stemline II	
100 ng/ml TPO	
100 ng/ml SCF	
100 ng/ml G-CSF	
100 IE/ml Penicillin	
100 µg/ml Streptomycin	
40 mM/ml L-Glutamin	
Fetales Kälberserum (FKS)	Universitätsapotheke Halle
Penicillin G	Fa. Jenapharm

Streptomycin	Fa. Strepto-Hefa
Amphotericin B	Fa. Squibb
L-Glutamin	Fa. Sigma
HEPES-Puffer	Fa. Bio Whittaker
Natriumhydrogencarbonat	Fa. Fresenius Kabi
Wasser für Injektionszwecke	Fa. Baxter

Kulturmedium 1:

100 ml MEM Eagle mit Earles BSS (10x) ohne NaHCO<sub>3</sub> und  
Glutamin  
100.000 E Penicillin G  
100 mg Streptomycin  
2,5 mg Amphotericin B  
292,2 mg L-Glutamin  
12,5 ml HEPES-Puffer  
2200,0 mg Natriumhydrogencarbonat  
ad 1000 ml Wasser für Injektionszwecke

Kulturmedium 1 wurde als fertige Lösung von Universitätsapotheke Halle bezogen. Hornhautmedium wurde aus 9 Teilen Kulturmedium 1 und einem Teil FKS gemischt.

**Lösungen**

Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)	Fa. Bayer
Ketavet (Ketamin) 100 mg/ml	Fa. Pharmacia
Natriumchlorid 0,9%	Fa. Fresenius Kabi
Fluoreszein SE Thilo	Fa. Alcon
Iono-Steril	Fa. Fresenius
Sevofluran	Abott GmbH

MACS-Puffer (PBS pH 7,2 mit 0,5% FKS und 2 mMol EDTA)



### **Geräte**

Auto-MACS	Fa. Miltenyi Biotech
FACS-Calibur	Fa. Becton-Dickinson
Digitalkamera DSC-F717 5,0 Mio. Megapixel	Fa. Sony
Endoskop mit 0°-Optik	Fa. Karl Storz-Endoskope
Blaufilter	Fa. Karl Storz-Endoskope
Blitzgenerator 600	Fa. Karl Storz-Endoskope
Mikrotom	Fa. Leica
Fluoreszenzmikroskop: Olympus BH2RFCA mit Quecksilber Höchstdrucklampe 100W/2	
Filtersätze: BP495 FITC, LP F11-007 533/50 und F 151006	
Kamera: Model 4.2 Diagnostik Instruments Visitron Systems Spot Insight QE	
Software: Visitron spot advanced	
Konfokalmikroskop: Leica confocal laser scanning microscope DM IRB	
Software: Leica confocal laser scanning microscope TCS SP2	

### **Versuchstiere**

Syngene Balb/C-Mäuse, 5 Wochen alt	Charles River, USA
------------------------------------	--------------------

## 9. Thesen

1. **Hornhautverletzungen zählen zu den häufigsten Verletzungen.** Verletzungen der Kornea sind weltweit die dritthäufigste Erblindungsursache.
2. **Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten von Hornhautverletzungen sind begrenzt.** Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahren sind die Ergebnisse der konservativen Behandlung schwerer Hornhautläsionen oft nicht zufriedenstellend.
3. **Alkaliverletzungen gehören zu den schwersten Hornhautverletzungen.** Der spezifische Pathomechanismus von alkalischen Hornhautverletzungen führt häufig zu protrahiertem Heilungsverlauf und schweren Komplikationen.
4. **Das Alkali-Defekt-Modell ist zur Untersuchung von kornealen Wundheilungsvorgängen geeignet.** Das Alkali-Defekt-Modell wurde in mehreren Untersuchungen zur Heilung kornealer Problemwunden verwendet, da an diesem Modell schwerste Hornhautverletzungen reproduzierbar hervorgerufen und standardisiert untersucht werden können.
5. **Die Entwicklung neuer Therapiemethoden zur Behandlung von Epithelläsionen der Hornhaut ist klinisch notwendig.** Da die aktuellen konservativen Behandlungsmöglichkeiten kornealer Verletzungen eingeschränkt sind, könnten neue Therapiemethoden zu einer Verbesserung der klinischen Prognose von Hornhautläsionen beitragen.
6. **Knochenmark- und Stammzellen haben ein hohes therapeutisches Potential.** Knochenmarks- und Stammzelltransplantationen werden seit Jahren erfolgreich in der Hämatologie und Onkologie, jedoch erst seit kurzer Zeit in anderen Fachgebieten der Medizin verwendet. Neuere Ergebnisse der Stammzellforschung konnten das therapeutische Potential von Stammzellen bei der Behandlung von Organschäden nachweisen.

7. **Eine Lokalthherapie mit Knochenmark- bzw. CD117+-hämatopoetischen Stammzellen wäre bei der Behandlung von Hornhautverletzungen im Gegensatz zu systemischen Behandlungen praktikabel.** Die systemische Transplantation von Knochenmark- und Stammzellen ist technisch aufwändig, teuer und für den Patienten risikobehaftet. Die Gewinnung von Knochenmark- und Stammzellen ist risikoarm. Eine Lokalapplikation dieser Zellen auf Hornhautulzera ist im Vergleich zu systemischen Transplantationen als risikoarm anzusehen.
  
8. **Der Vergleich des Einflusses kompletten Knochenmarks und CD117+-hämatopoetischer Stammzellen auf die korneale Wundheilung lässt Rückschlüsse auf die Wirkungsmechanismen der verschiedenen Zellen zu.** CD117+-hämatopoetische Stammzellen stellen eine kleine Fraktion des Knochenmarks dar. Die Eigenschaften der Stammzellen unterscheiden sich von denen des Knochenmarks.
  
9. **Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von lokal applizierten Knochenmarkzellen und lokal applizierten CD117+-hämatopoetischen Stammzellen auf die Heilungsrate und Heilungsgeschwindigkeit kornealer Alkaliverletzungen als ersten Schritt neuer Therapieansätze zu untersuchen.** Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von 85 Stunden mit einer Unterteilung in Therapie- und Beobachtungszeitraum. Die Zellen wurden mit einem Zelltracer markiert, um bei histologischen Untersuchungen Rückschlüsse auf mögliche Wirkmechanismen zu ermöglichen.
  
10. **Aus dem Knochenmark von 40 männlichen Balb/C-Mäusen wurden CD117+-hämatopoetische Stammzellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS) gewonnen und über Nacht in Stammzellmedium kultiviert.** Die Hornhäute von 48 weiblichen Balb/C-Mäusen wurden in Narkose standardisiert mit 0,1 M NaOH verätzt. Dabei wurde eine Läsion von 2 mm Durchmesser gesetzt. Nach 6 Stunden *in vivo* wurden die Augen entnommen und in Kultur gebracht. Im Therapiezeitraum zu den Zeitpunkten 6, 12 und 16 h wurden jeweils 25 µl Stammzellmedium, Knochenmarkzellen (1000 Zellen/µl) oder CD117+-hämatopoetische Stammzellen (1000 Zellen/µl)

auf die Hornhautläsionen appliziert und 500 µl Hornhautmedium hinzugegeben. Anschließend wurden die Augen aller drei Gruppen im Beobachtungszeitraum zu den Zeitpunkten 20, 24, 36, 48, 60, 72 und 85 h in 525 µl Hornhautmedium gehalten. Die Größe der Läsionen wurde zu den Untersuchungszeitpunkten photographisch dokumentiert.

11. **Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), Student's t-Test und der Kaplan-Meier-Analyse.** Die Zelltherapien mit Knochenmarkzellen und CD117+-hämatopoetischen Stammzellen sind der Kontrollgruppe statistisch signifikant überlegen.
12. **Lokal applizierte Knochenmark- und CD117+-hämatopoetische Stammzellen erhöhen die Heilungsrate kornealer Alkaliverletzungen.** Die Förderung der Wundheilung bei beiden Therapiemethoden ist in diesem *in vivo/in vitro* Modell gleichwertig. Beide Zelltherapieansätze zeigten gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten therapeutischen Nutzen.
13. **Lokal applizierte Knochenmarkzellen und CD117+-hämatopoetische Stammzellen beschleunigen die korneale Wundheilung.** Die Effektivität beider Zelltherapien ist vergleichbar. Die Wundheilung in den Zelltherapiegruppen erfolgte signifikant schneller als in der Kontrollgruppe.
14. **Ein bleibender Effekt der applizierten Zellen nach beendeter Therapie ist sowohl bei der Verwendung von Knochenmarkzellen als auch von CD117+-hämatopoetischen Stammzellen zu beobachten.** Nach Beendigung der Therapie war auch weiterhin ein Unterschied der relativen Heilungsgeschwindigkeit zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe festzustellen.
15. **Eine Integration der applizierten Zellen in das korneale Epithel konnte weder für Knochenmarkzellen noch für CD117+-hämatopoetische Stammzellen eindeutig nachgewiesen werden.** Der verwendete Zelltracer konnte zwar im Epithel der behandelten Hornhäute nachgewiesen werden, ließ sich jedoch keiner Zelllinie konkret zuordnen. Aus diesem Grund kann

eine Integration der applizierten Knochenmark- und CD117+-hämatopoetischen Stammzellen nicht eindeutig bestätigt werden.

16. **Die untersuchten Therapieansätze zeigten klar positive Effekte auf Heilungsrate und –geschwindigkeit kornealer Alkaliverletzungen.** Da die Ergebnisse in einem *in vivo/in vitro* Modell gewonnen wurden, sollten weitere Untersuchungen *in vivo* erfolgen, um eventuelle unerwünschte Nebeneffekte festzustellen. Sowohl die Lokalapplikation von Knochenmarkszellen als auch die Lokalapplikation von CD117+-hämatopoetischen Stammzellen bieten therapeutisches Potential und könnten neuartige Behandlungen schwerer kornealer Läsionen ermöglichen.

## **Tabellarischer Lebenslauf**

von Ulf Martin Schilling  
Anschrift: Puschkinstr. 13  
98527 Suhl  
0162-7844202

Geboren am 13.03.1977 in Greifswald, ledig

Vater: Dr. rer. nat. Hans-Joachim Schilling, geb. 20.11.1947, Beruf: Physiker

Mutter: Dr. med. Christiane Schilling, geb. Zeth, geb. 04.07.1947, Beruf: Ärztin

1983-1991 4. Polytechnische Oberschule Fritz-Köhler, Suhl  
1991-1995 Erstes Staatliches Gymnasium Suhl, Abschluss mit Abitur  
1995-1996 Zivildienst am städtischen Fachkrankenhaus Zella-Mehlis  
1996-1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig (Physikum)  
1998-1999 Studium der Humanmedizin an der Universidad Complutense de Madrid, Spanien  
1999-2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig  
2000 Erstes Staatsexamen  
2001 Zweites Staatsexamen  
2001-2002 Praktisches Jahr an der Université Henri Pointcaré, Nancy, Frankreich  
2002 Praktisches Jahr an der Universität Leipzig  
2002 Drittes Staatsexamen an der Universität Leipzig  
2002-2004 Arzt im Praktikum im Landstinget Dalarna, Schweden  
2004-2006 Forschungen zur Dissertation an der Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg

Suhl, den 30.07.2006

Ulf Martin Schilling

### **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten oder Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Halle, den 30.07.2006

Ulf Martin Schilling

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Halle, den 30.07.2006

Ulf Martin Schilling



## **Hinweis auf Publikationen**

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Vortrag auf der DOG 2006: Sel S, Schilling UM, Friebel K, Ehrich D, Simm A, Nakhai H, Hoppe C, Duncker G.I.W, Paulsen F: „**Lokale Applikation von CD117+hämatopoetischen Stammzellen beschleunigt die Abheilung von Hornhautulcera**“

Vortrag auf der SATH 15 (2006): Schilling UM, Friebel K, Ehrich D, Simm A, Nakhai H, Hoppe C, Duncker G.I.W, Paulsen F, Sel S „**Einfluss von lokal appliziertem Knochenmark und CD117+hämatopoetischen Stammzellen auf die korneale Wundheilung**“

Posterpräsentation auf der zweiten Biennialen Leopoldina Konferenz 2006: Sel S, Schilling UM, Friebel K, Ehrich D, Simm A, Nakhai H, Kalinski T, Hoppe C, Duncker G.I.W, Paulsen F: „**Einfluss von lokal appliziertem Knochenmark und CD117+hämatopoetischen Stammzellen auf die korneale Wundheilung**“

Manuscript in preparation (IOVS): Sel S, Schilling UM, Friebel K, Ehrich D, Simm A, Nakhai H, Hoppe C, Duncker G.I.W, Paulsen F: “**Application of CD117+hematopoietic stem cells and bone marrow cells promotes the healing of corneal ulcers**”

### Danksagungen

*Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. G.I.W. Duncker danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung bei der Bearbeitung und die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können.*

*Meinem Betreuer Herrn Dr. med. S. Sel danke ich für seine Hilfe bei der Konzeption des Projekts. Für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die Begleitung während der Fertigstellung dieser Arbeit bin ich ihm zutiefst verpflichtet.*

*Herrn Prof. Dr. med. F. Paulsen gilt mein Dank für das freundlicherweise zur Verfügung gestellte Material und die Ratschläge zur praktischen Realisierung der Experimente.*

*Herrn PD Dr. rer. nat. A. Simm danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Separierung der Zellen.*

*Mein besonderer Dank gilt Frau Elke Vetter und Frau Simone Kahrstedt für ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Versuche.*

*Weiterhin danke ich meiner Familie, die mich jederzeit unterstützte.*